

Faculté des Sciences Exactes et d'Informatique
Département de chimie
Filière : chimie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master en chimie
Option : chimie appliquée

THEME :

**TRANSFORMATION DE LA CHITINE EN CHITOSANE :
CARACTERISATION ET ETUDE DE LA SOLUBILITE**

Etudiant(e) : « Zeroual Abir Nour elhouda » « Kellali Asmaa Aicha »

Encadrant(e) : « Dr. Ing. C. Harrats »

Année Universitaire 2018-2019

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DEDICACES

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

OBJECTIF DU TRAVAIL

CHAPITRE I: LA CHITINE ET LE CHITOSANE

I.	Aperçu historique.....	02
II.	La chitine.....	02
1.	Structure cristalline de la chitine.....	03
2.	Source de la chitine.....	05
3.	Procédé d'extraction de la chitine.....	06
3.1.	Déminéralisation.....	07
3.2.	Déprotéinisation.....	08
3.3.	Décoloration.....	08
III.	Le chitosane.....	09
1.	Structure du chitosane.....	09
2.	Production de chitosane à partir de la chitine.....	10
3.	Propriétés physico-chimiques du chitosane.....	12
3.1.	Le Degré de Désacétylation (DDA) ou le Degré d'Acétylation(DA).....	12
3.2.	La solubilité et la masse molaire.....	12
IV.	Domaines d'application du chitosane.....	13

CHAPITRE II : EXPLOITATION DES CRUSTACES (CREVETTES) EN VU DE LA PREPARATION ET LA CARACTERISATION DE LA CHITINE ET DU CHITOSANE

Partie I: Exploitation des crustacés (crevettes) en vu de la préparation de la chitine et du chitosane

I.	Collecte et traitement des crevettes.....	06
1.	Prétraitement des carapaces de crevette.....	16

2.	Extraction de la chitine.....	17
2.1.	Déminéralisation.....	18
2.2.	Déprotéinisation.....	19
2.3.	Décoloration.....	19
3.	Préparation du chitosane par désacétylation de la chitine.....	21
II.	Résultats et discussion.....	23
III.	Conclusion.....	25
Partie II : caractérisation de la chitine et du chitosane		
I.	Introduction.....	26
1.	Spectroscopie infrarouge par transformée de fourrier (FTIR).....	26
1.1.	Principe.....	26
1.2.	Méthode de préparation de l'échantillon.....	26
2.	Dosage pH-métrique ou potentiométrique.....	27
2.1.	Principe.....	27
2.2.	Méthode du dosage des échantillons.....	27
II.	Calcul du degré de désacétylation (DDA%) du chitosane.....	27
III.	Conclusion.....	36

CHAPITRE III : ETUDE DE LA SOLUBILITE DU CHITOSANE

I.	Introduction.....	38
I.	Expérimentation.....	39
1.	Solubilité en fonction de la concentration et la température.....	39
2.	Solubilité en fonction du degré de désacétylation DDA%.....	39
3.	Solubilité en fonction du pH.....	39
4.	Solubilité en fonction du taux de glycérol.....	40
II.	Résultat et discussion.....	41
1.	Taux de solubilité en fonction de la concentration et la température.....	41
2.	Effet du pH de l'acide acétique sur la solubilité du chitosane.....	47
3.	Effet du degré de désacétylation sur la solubilité.....	48
4.	Effet de l'ajout du glycérol sur la solubilité du chitosane.....	50
5.	Mesure de l'indice de réfraction.....	50
IV.	Conclusion.....	54

CONCLUSION GENERALE.....	55
LISTE DES FIGURES.....	57
LISTE DES TABLEAUX.....	60
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	62

Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

A nos parents pour nous avoir encouragé, par leur patience et leur motivation. Et aussi, pour nous avoir poussé à travailler et à faire des efforts. Sans eux, nous n'en serions pas là.

Nous tenons à remercier notre encadrant Mr : C. Harrats, pour l'orientation, la confiance et la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

Nos remerciements vont aussi aux professeurs Mr A. Belouatek et Mr M. Belhakem les directeurs successifs du Laboratoire de Structure, Elaboration et Application des Matériaux Moléculaires (SEA2M) à la Faculté des Sciences Exactes et de l'Informatique (FSEI).

Nous tenons également à remercier les techniciens du laboratoire pédagogique de chimie appliquée à la faculté des sciences exactes et de l'informatique (FSEI), Mr Hmida et M^{elle} Touatia pour leur précieuse aide.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs compétences.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et soutenu dans la poursuite de nos études.

Enfin, à nos amis et nos proches qui par leurs prières et leurs encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à:

Mes très chers parents pour leurs encouragements, leurs aides et qui sans eux rien n'aurait été possible

A ma chère et adorable amie Belhamiti Batoul et toute sa famille

A ma collègue de binôme Asmaa et toute sa famille

A tous mes ami(e)s que j'aime et que je respecte ; chacun à son nom

Abir

“Believe you can and you're halfway there”

T. Roosevelt

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents pour tout leur sacrifice, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

Dieu les garde pour moi.

A mes sœurs et mes cousines

A ma petite sœur Jija

A ma collègue de binôme Abir et toute sa famille

A mes chers amis : Mohamed, Amin, Asmae, Fouzia, Badrou, Hafida et Siham.

A mes camarades de la promotion ainsi que tous ceux qui me connaissent.

A tous ceux que j'aime et tous ceux qui ont une place particulière dans Mon cœur

Merci !

ASMAA

INTRODUCTION GENERALE

Par souci de préservation de l'environnement et en vue de remplacer les polymères synthétiques, l'industrie des plastiques s'est tournée vers les matériaux d'origine naturelle. Le présent travail focalise sur le chitosane qui provient de la désacétylation de la chitine contenue dans les carapaces des arthropodes (crabes, crevettes ou homards par exemple).

Les biomasses marines et leur diversité constituent un ensemble de ressources naturelles exploitables et valorisables. Les océans produisent une biomasse supérieure à celle provenant des terres émergées, mais seule une partie minime issue des activités de pêche est exploitable. Cela représente tout de même près de 85 millions de tonnes de produits divers (poissons, mollusques, crustacés, etc..) prélevé par an [1]. Environ 10 % des captures globales des produits aquatiques sont des organismes riches en matière chitineuse (10 à 55% en poids sec).

La chitine et ses dérivés font partie de la grande famille des polymères naturels à côté de la cellulose, l'amidon et le collagène. Le chitosane et la chitine sont des polysaccharides contenant plus de 5 000 unités de glucosamine et d'acétylglucosamine, respectivement, et leurs poids moléculaires sont supérieurs à un million de Daltons.

Le chitosane est le dérivé le plus important de la chitine qui est le polysaccharide le plus abondant sur terre après la cellulose [2].

La chitine est un polysaccharide polymère, représenté couramment par des chaînes linéaires de N-acétyl-D-glucosamine.

Le chitosane est un polysaccharide cationique naturel linéaire formé d'unités D-glucosamines liées entre elles par des liens glycosidiques et de N-acétyl-D-glucosamines.

L'obtention du chitosane à partir de la chitine nécessite l'usage de quantités importantes d'acides et de bases. Les trois grandes étapes du procédé de transformation sont une déprotéinisation basique des co-produits, suivie d'une déminéralisation acide et enfin une désacétylation (élimination des groupements acétyles de la chitine). Cette dernière étape est cruciale car elle permet le passage de chitine à chitosane. Elle conditionne les propriétés du futur polymère, en fonction d'un paramètre central : le degré de désacétylation. Ce dernier va influencer sur toutes les propriétés physico-chimiques du chitosane (masse moléculaire, viscosité, solubilité, etc.). Le chitosane est filable, filmogène, biodégradable, biocompatible et antimicrobien.

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré de polymérisation (DP) ; c'est-à-dire par le nombre d'unités qui constituent la chaîne du polymère, et par leur degré d'acétylation (DA), c'est-à-dire le pourcentage d'unités acétylées. Ces paramètres modulent par exemple la densité de charge du polymère, et donc sa solubilité et ses biofonctionnalités. D'autres caractéristiques sont parfois mesurées en raison de leur influence sur les propriétés du polymère, tels que l'indice de cristallinité et la poly-dispersion des unités de glucosamine (Glu) et N-acétylglucosamine (NacGlu). Les applications de la chitine et de ses dérivés sont liées à leurs propriétés [3].

Grace à sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et ses propriétés antibactériennes, le chitosane trouve des applications dans l'industrie alimentaire, le biomédical, la cosmétique, le traitement de l'eau ou l'agriculture [4]. Dans l'industrie alimentaire, le chitosane est surtout utilisé pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques car il permet d'empêcher ou de ralentir le développement des bactéries ou moisissures à la surface des aliments.

La solubilité d'un polymère est liée aux interactions intra et inter moléculaire entre les chaînes. Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques. Il est une base faible qui, en milieu acide, devient un polyélectrolyte en raison de la protonation des groupes $-NH_2$. Les propriétés d'un chitosane en solution dépendent non seulement de son DA moyen, mais également de la distribution des groupes acétyle le long de la chaîne principale et du poids moléculaire [5-7]. La désacétylation, généralement effectuée à l'état solide, donne une structure irrégulière en raison du caractère semi-cristallin du polymère initial.

La chitine n'est soluble que dans des solvants peu communs ; ce qui limite son utilisation et sa valorisation. Ceci constitue l'inconvénient majeur qui rend difficile sa caractérisation. Des recherches récentes portent sur le potentiel des liquides ioniques pour solubiliser la chitine [8, 9].

Vu sa nature polyélectrolyte cationique, le chitosane n'est soluble que dans un milieu acide faiblement dilué. Sa solubilité dépend, entre autres, du pH du milieu, de son degré de désacétylation et de la méthode de désacétylation mise en œuvre [10]. La problématique de la solubilité du chitosane continue d'alimenter les débats scientifiques dans la littérature.

Les objectifs de ce travail

Ce travail s'inscrit dans la continuité d'une recherche initiée en 2018 au sein de notre faculté FSEI à l'université de Mostaganem et qui explore les potentialités des ressources naturelles locales en matière de matériaux. Le chitosane obtenu de la chitine, elle-même extraite des carapaces de crevettes, est un de ces matériaux polymères naturels qui nous intéresse. Beaucoup de travaux sont publiés dans la littérature sur le chitosane. On y trouve des études sur les méthodes de préparation [11], les propriétés physicochimiques [2] et l'exploration d'applications dans différents domaines [4].

En plus à la transformation des carapaces de crevettes en chitine et la modification chimique de celle-ci en vue d'obtenir du chitosane et sa caractérisation physico-chimique, nous nous sommes attelés à étudier sa solubilité sous différentes conditions.

CHAPITRE I
LA CHITINE ET LE CHITOSANE

I. Aperçu historique

La chitine a été découverte par le scientifique anglais A. Hachett, qui a rapporté en 1799 "un matériau particulièrement résistant aux produits chimiques habituels" [12], mais comme il n'a pas poussé ses investigations plus loin, la découverte de la chitine est généralement attribuée à un naturaliste français de Nancy, Henri Braconnot, qui a identifié ce biopolymère en 1811 et lui a donné le nom de "fungine" [13].

En 1823, en étudiant la cuticule de l'insecte coléoptères, August Odier isolait ce même polymère et le nomma « chitine » à partir du grec « kitos » qui signifie l'enveloppe.

En 1843, Jean-Louis Lassaigne a trouvé la présence d'azote dans la chitine, en travaillant avec l'exosquelette du papillon de vers à soie, *Bombix morii*. Ensuite, Georg Ledderhose a identifié la glucosamine et l'acide acétique comme unités structurales de la chitine en 1879, et Paul Gilson a confirmé que la glucosamine était l'unité répétée de la chitine en 1894 [14].

Le chitosane a d'abord été obtenu à partir de la chitine par C. Rouget, lors de l'ébullition de la chitine dans une solution alcaline concentrée et en notant que le composé résultant était soluble dans les acides organiques. De plus, Hoppe-Seyler a confirmé en 1894 que le chitosane est la forme désacétylée de la chitine et lui a donc donné son nom actuel [15]. La production de la chitine a débuté en 1920, mais la structure des biopolymères (chitine et chitosane) n'a été identifiée que 50 ans plus tard grâce à la cristallographie et la spectroscopie infrarouge [16].

Depuis 1970 la production industrielle et l'utilisation de ces deux biopolymères, issus de ressources renouvelables, sont en constante augmentation [17]. Actuellement, la production de la chitine et du chitosane à partir des carapaces de crabes et de crevettes est devenue économiquement rentable [4].

I. La chitine

La chitine est un biopolymère biodégradable et biorésorbable ; deux propriétés primordiales à notre époque où la protection de l'environnement est devenue une préoccupation de presque tout le monde. De plus, la chitine est non toxique, biocompatible et renouvelable [18]. Largement présente au sein du règne animal, elle constitue le squelette polysaccharidique d'arthropodes, annélides, mollusques et cœlentérés.

La chitine est un polysaccharide linéaire formé d'unités de N-acétyl-D-glucosamine reliés entre elles par une liaison du type β -(1-4) ou 2-acétamido-2-deoxy- β -D-glucopiranosose. Il faut noter que la formule chimique de la cellulose est très proche de celle de la chitine, le groupe C(2) hydroxyle a été remplacé par les groupements d'acétamide. Roberts associe cette similarité entre la molécule de la chitine et celle de la cellulose à une fonction similaire ayant la structure ci-dessous (figure 1) [12].

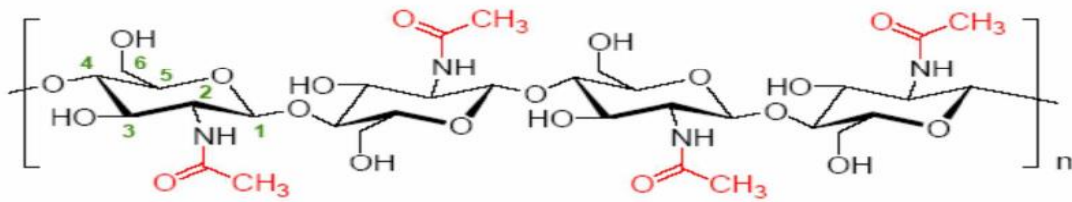


Figure 1 : la structure chimique de la chitine

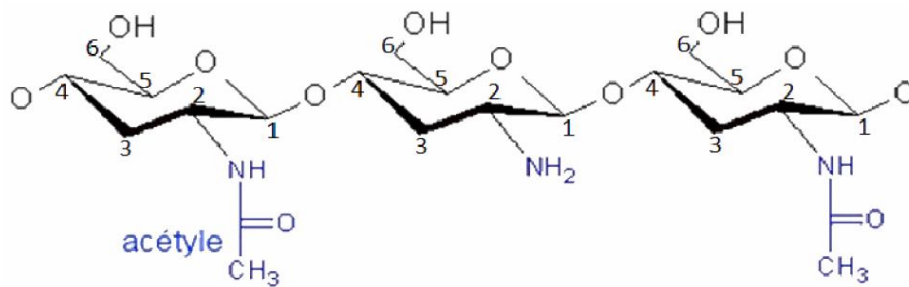


Figure 2 : Représentation générale de la chitine comme copolymère de glucosamine et N-acétylglucosamine

1. Structure cristalline de la chitine

La présence de groupements acétamide confère à la chitine des fonctions biologiques telles que la biodégradabilité et la biocompatibilité, ce qui fait d'elle un matériau fonctionnel important [19]. La chitine possède une grande stabilité structurale due à la présence de fortes liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires (Figure 3). Les principales caractéristiques de la chitine sont son degré d'acétylation et sa cristallinité. Elle présente trois formes cristallines, α , β et γ (Figure 4), qui diffèrent par l'arrangement de la chaîne polysaccharidique et par la disposition des liaisons hydrogène [20,21].

α-chitine : est la forme la plus stable et la plus abondante. Elle est présente chez les crustacés et les champignons. Elle est caractérisée par des chaînes antiparallèles constituant une structure cristalline régulière. Les liaisons hydrogène intermoléculaires confèrent au polymère une grande stabilité vis-à-vis des solvants et des solutions aqueuses. Cependant, l'utilisation de solvants spécifiques tels que le N,N-diméthylacétamide (DMAc) contenant de 5-10 % de LiCl et des solutions à base de fluorine hexafluoroacétone et hexafluoroisopropanol favorise la solubilisation de l'*α-chitine*. Cette solubilité dépend également de la source du polymère [22].

La *β-chitine* : les macromolécules sont organisées sous un arrangement parallèle conduisant à des liaisons intermoléculaires de faible énergie. Dans ce cas, les groupes N-acétyl jouent le rôle d'espaces, facilitant l'accès aux molécules d'eau, à des fins d'hydratation et de formation de gel [23]. En opposition avec l'*α-chitine*, la *β-chitine* a une grande affinité pour les solvants organiques et l'eau [24]. Elle se trouve essentiellement dans les épines des diatomées et dans l'endosquelette de seiche.

La *γ-chitine* a été identifiée dans les cocons des insectes [25]. Elle est principalement composée de deux couches parallèles et d'une couche antiparallèle. Sa force et sa résistance sont plus proches du type β ; les groupes N-acétyl jouant le même rôle dans ces deux arrangements [26, 27].

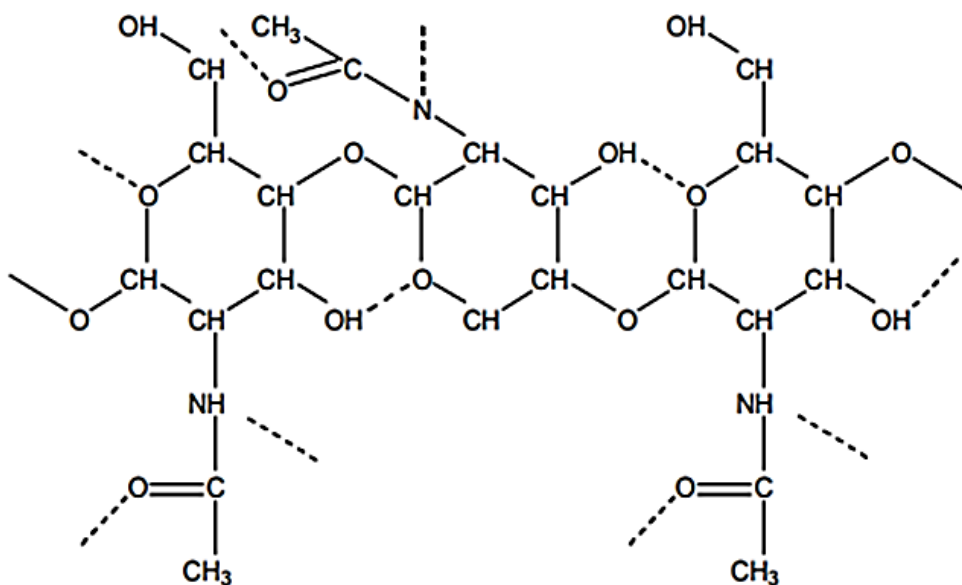


Figure 3 : Les liaisons hydrogène en pointillés dans la structure de la chitine

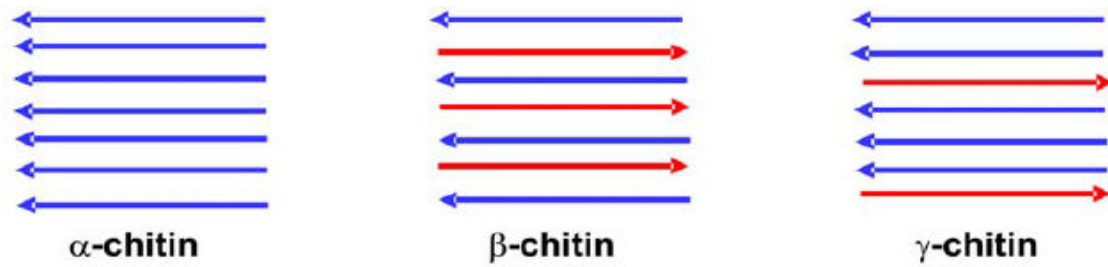


Figure 4 : Schémas simplifiés des trois formes cristallines de la chitine.

2. *Source de la chitine*

Dans le règne animal, la chitine est un élément structurel important des téguments de certains invertébrés. Elle n'existe que sous la forme de complexes avec des protéines et des minéraux. Elle est présente principalement dans les coquilles de mollusques, dans les cuticules des insectes et dans la carapace des crustacés.

Dans le règne végétal, la chitine se trouve dans la paroi de la plupart des champignons et de certaines algues chlorophycées. En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique. La chitine est présente aussi dans certaines levures et bactéries [28].

Bien que les sources potentielles de chitine soient très nombreuses (Tableau 1), elle est essentiellement produite aujourd'hui à partir des carapaces de crevettes.

Tableau 1 : Sources potentielles de la chitine [29]

<i>Sources</i>	<i>Sites de présence</i>	<i>Teneur en chitine (en %)</i>
Arthropodes : <ul style="list-style-type: none">• Crustacés (crevette)• Insectes• Arachides	Exosquelettes, cuticules membranes	2-72
Mollusque : <ul style="list-style-type: none">• Seiche• Pieuvres /calmars	Coquilles, stomacales, dents, plaques, plumes,	6-40
Polyplacophores	Tube	33
Cnidaires	Capsules d'œufs, membrane	3-30
Annélides <ul style="list-style-type: none">• Sangsue• Lombric	Soies	0.2-38
Brachiopodes	Cuticules, coquilles	4-29
Champignons	Paroi cellulaire, tige, spore	/
Algues	Paroi cellulaire	Faible

3. Procédé d'extraction de la chitine

La production de chitine repose sur la purification de la matière première. L'attention est principalement portée sur l'élimination du carbonate de calcium, des protéines et des pigments.

L'extraction chimique consiste en un traitement acide pour la déminéralisation, un traitement alcalin pour la déprotéinisation et une décoloration avec un oxydant a fin d'éliminer les pigments. Les autres composés minoritaires sont éliminés aussi au cours de ces deux réactions. La déminéralisation précède généralement la déprotéinisation car l'inverse aurait un impact sur le DP et le DA du polymère [30]. Entre chaque étape, le produit est rincé

abondamment à l'eau distillée. La figure 5 schématise la production de la chitine et du chitosane.

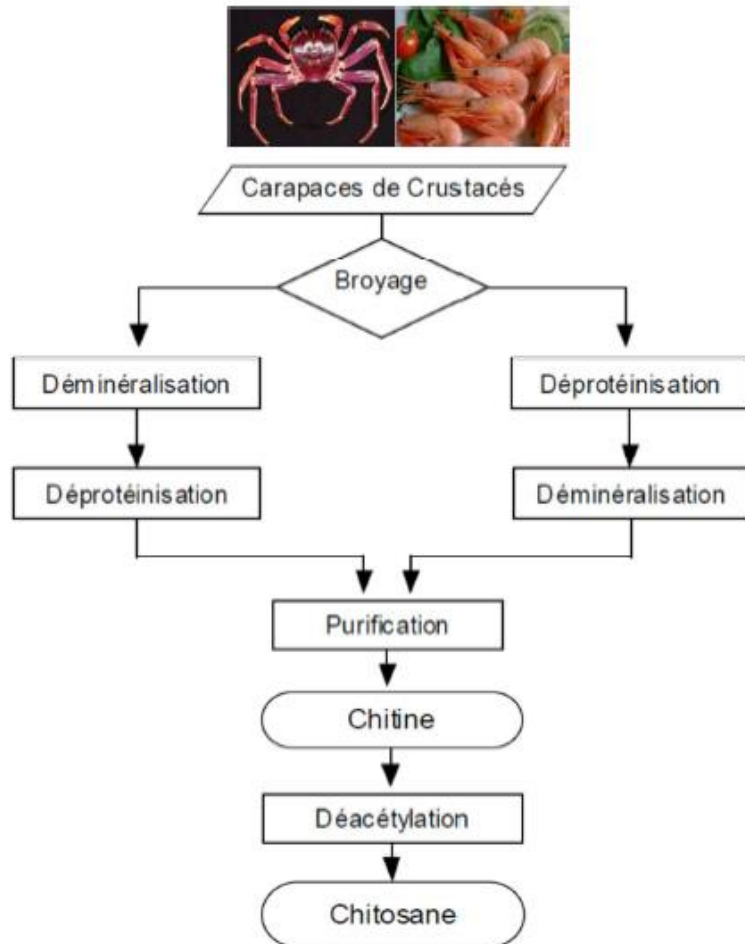
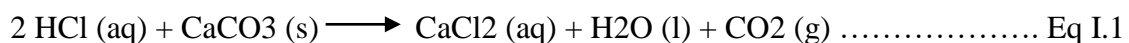


Figure 5 : Procédé d'extraction de la chitine et du chitosane.

3.1. Déminéralisation

Le traitement acide élimine les minéraux qui passent en solution sous forme de sels. Pour des raisons économiques, l'acide hydrochlorique (HCl) est privilégié.

La concentration minimale, pour mener cette étape, est déterminée par l'équation chimique (Eq I.1) de la réaction entre l'élément minéral majoritaire, le carbonate de calcium et HCl. En principe, la déminéralisation est complète dès lors où les proportions sont stœchiométriques, mais dans la pratique on utilise des solutions en excès.



Les concentrations en HCl rencontrées sont comprises entre 0,5 et 11 N et le ratio substrat/solvant entre 1:10 et 1:40. Le temps de la déminéralisation varie entre 15 min et 48 h et la température de réaction est choisit entre l'ambiante jusqu'à 50 °C [31, 32].

La prolongation de la durée du traitement, une température élevée et une solution acide trop concentrée conduisent à l'hydrolyse des liaisons glycosidiques et par conséquent à la dépolymérisation de la chaîne carbonée de la chitine et du chitosane, ce qui provoque une diminution de la masse moléculaire [33, 34].

3.2. Déprotéinisation

A l'état naturel, la chitine se présente en association avec les protéines (Chitinoprotéine). Ces protéines sont éliminées par un traitement basique en utilisant des solutions à base de NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO, Ca(OH)₂ ou NaPO₄, à des concentrations variables de 0.1 à 5 mol/L. la solution d'hydroxyde de sodium (10 % massique) est la plus souvent utilisée pour solubiliser les protéines. Selon un ratio compris entre 1:10 et 1:40, la durée du traitement basique est de l'ordre de 0.5 à 72 heures à des températures comprises entre 50° et 100°C. Ces deux paramètres sont liés. La durée de la réaction doit être augmentée si la température est basse, et réciproquement.

L'augmentation de la concentration, de la durée et de la température de réaction améliorent la déprotéinisation [35]. Cependant, tout comme la déminéralisation, les conditions drastiques de la déprotéinisation modifient la structure originelle de la chitine.

3.3. Décoloration

Cette étape est optionnelle car la couleur de la chitine n'a apparemment pas d'impact sur la structure du chitosane mais juste un effet de blanchiment du produit pour des fins commerciales. Cependant, il est très difficile d'obtenir un produit pur à cause des fortes interactions entre la chitine, les pigments et les protéines.

Le blanchiment est souvent réalisé par un traitement avec des agents oxydants (KMnO₄, NaOCl, SO₂, NaHSO₃, Na₂S₂O₄ ou H₂O₂). Ce traitement peut éliminer des traces de pigments résiduels, comme les caroténoïdes. Durant le processus de blanchiment, le réactif utilisé ne doit pas avoir un effet négatif sur les propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane.

Généralement, l'agent de blanchiment employé est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), dont la concentration est comprise entre 0,1 et 33 %. Il peut également être mélangé avec HCl. La durée du traitement est souvent de l'ordre de quelques minutes [2].

En effet, tout comme les deux étapes précédentes, les conditions de décoloration induisent une altération de la structure de la chitine, qui se traduit par une réduction du poids moléculaire.

II. *Le chitosane*

Le chitosane est un copolymère naturel, non toxique, biodégradable, linéaire et flexible de 2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranose et 2-amino-2-déoxy- β -D-glucopyranose, possédant des propriétés antibactériennes. C'est un polysaccharide comme la cellulose. Cette macromolécule est obtenue par N-déacétylation d'un des polymères naturels les plus abondants, la chitine, extraite des carapaces de crustacés tels que les crabes et les crevettes [19].

Il est disponible sous forme de solutions, granules, poudre ou fibre. Le chitosane disponible sur le marché a un DDA de 70 à 90 % [36].

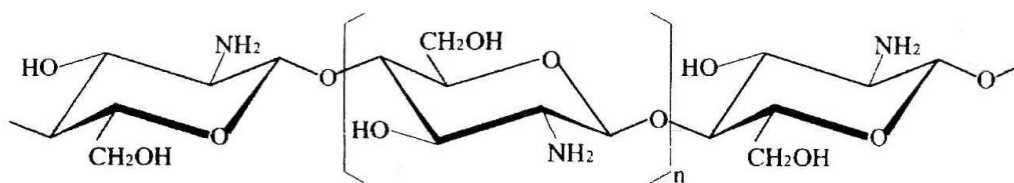


Figure 6 : la structure du chitosane.

1. *Structure du chitosane*

Le chitosane complètement désacétylé est un polysaccharide régulier composé d'unités de glucosamine unies par des liens glycosidiques β (1-4). La structure du chitosane ne diffère de la structure de la cellulose que par la présence d'un groupe amine en position deux (C2) au lieu d'une fonction alcool (-OH) pour la cellulose. Cette particularité structurale confère au chitosane une plus grande variabilité au niveau des groupes fonctionnels [37]. La présence de trois groupes fonctionnels nucléophiles distincts par unité entraîne une souplesse potentielle des transformations chimiques régiosélectives. En ordre croissant de réactivité nucléophile, chaque unité de chitosane présente les groupes fonctionnels suivants: une fonction alcool

secondaire en position 3 (C3), une fonction alcool primaire en position 6 (C6) et une fonction amine primaire en position 2 (C2). Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés très intéressantes. Le chitosane en solution acide faible, possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement [38].

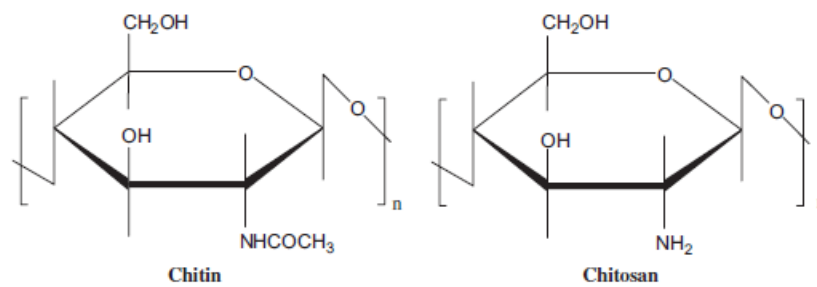


Figure 7: structure chimique de la chitine et du chitosane

2. Production de chitosane à partir de la chitine

Les techniques actuelles permettent d'obtenir une chitine partiellement purifiée en effectuant une déminéralisation et une déprotéinisation de la carapace de crustacés (crevettes dans notre cas). En partant de la chitine, on peut moduler le degré d'acétylation (DA) et la masse molaire du polymère, pour obtenir des chitosanes variés grâce à des hydrolyses basiques contrôlées.

Si l'extraction de la chitine est aujourd'hui facilement réalisable, l'étape la plus délicate reste la désacétylation qui nécessite de substituer suffisamment de groupements acétyle pour aboutir au chitosane, ce qui peut entraîner une réduction excessive de la longueur de la chaîne du polymère. En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur la température, il est possible d'obtenir différents grades de chitosane à partir d'une même chitine.

Un DA inférieur à 10 % est rarement atteint par un procédé simple. La désacétylation totale nécessite plusieurs étapes. L'échantillon étant soit lavé, soit dissous et re-précipité entre deux cycles.

La désacétylation est généralement effectuée par un traitement à la soude ou à la potasse concentrée (40-50 %) à une température ≥ 100 °C, pendant au moins 30 minutes pour enlever certains ou tous les groupements acétyle de la chitine [39].

La désacétylation ne peut pas être réalisée avec un réactif acide [19]. Il y a plusieurs facteurs essentiels qui affectent le rendement de la désacétylation comme la température, la durée du traitement, la concentration d'alcalin, les traitements préalables pour l'obtention de la chitine, l'atmosphère (air ou azote), la quantité de chitine par rapport à la solution alcaline, la densité de la chitine et la taille des particules. Compte tenu de tous ces paramètres, l'objectif idéal de la désacétylation est de préparer un chitosane qui est non dégradé, non réticulé et suffisamment soluble dans les acides organiques communs dilués (acides acétique, lactique et citrique).

La chitine peut être convertie en chitosane par :

- Voie chimique : une désacétylation alcaline homogène ou hétérogène (la plupart de ces méthodes utilisent NaOH ou KOH [40]).
- Voie enzymatique : avec la chitine désacétylase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons N acétamide de la chitine [41].

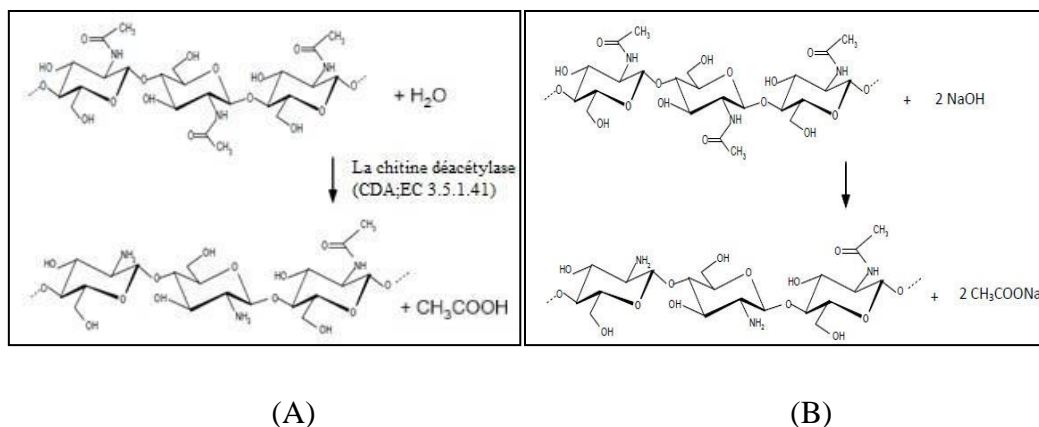


Figure 8 : (A) La désacétylation enzymatique ; (B) la désacétylation chimique de la chitine

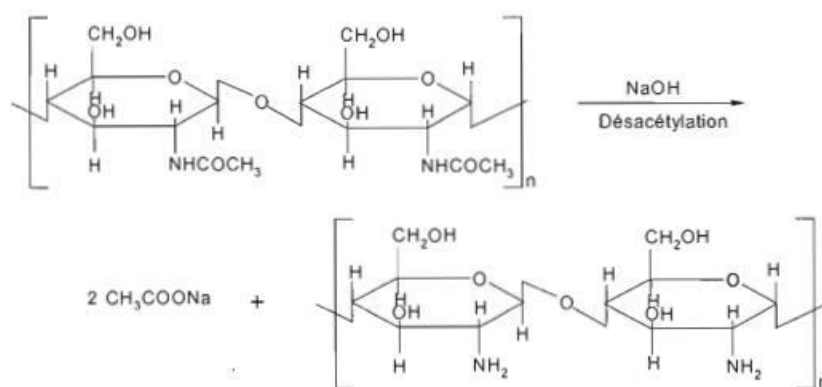


Figure 9 : La réaction de désacétylation de la chitine.

3. Propriétés physico-chimiques du chitosane

Les propriétés physico-chimiques du chitosane dépendent essentiellement de sa masse molaire et de son degré de désacétylation (DDA) ou de son degré d'acétylation (DA).

3.1. Le Degré de Désacétylation (DD) ou le Degré d'Acétylation(DA)

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré de désacétylation (DDA) et par leur masse molaire, dont la détermination nécessite la mise en solution du polymère. De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le degré d'acétylation (DA) sur des échantillons solides par spectroscopie IR [42], analyse élémentaire [43], RMN solide [44] ou sur des échantillons en solution par spectrophotométrie UV [45], titrage colloïdal [46] et RMN liquide [36].

Le degré d'acétylation (DA) est défini comme étant la fraction molaire des unités acétylées (unité acétyl glucosamine). Le degré de désacétylation ($DDA=1-DA$) représente la proportion d'unités amine-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités glycosidiques [2].

Le degré de désacétylation (DDA) est l'une des propriétés les plus importantes du chitosane. Il influe non seulement sur les caractéristiques physico-chimiques, mais aussi sur la biodégradation et l'activité immunologique du chitosane [47].

3.2. La solubilité et la masse molaire

La chitine est soluble dans très peu de solvants. Sa masse molaire initiale est de l'ordre de 8×10^5 à 10^6 g.mol⁻¹ et elle est fortement acétylée. Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire de l'ordre de 200000 g.mol⁻¹ et un DDA allant de 50 à 100 %. Pour le

chitosane, la masse molaire et la répartition des motifs N-acétylés le long de la chaîne sont dépendantes de la méthode de désacétylation utilisée. De plus, un enchaînement successif de plusieurs motifs N-acétylés confère au polymère un caractère plus hydrophobe, et donc des propriétés auto associatives (propriétés épaississantes et gélifiantes) et modifie sa solubilité.

En raison de sa solubilisation en solution acide, le chitosane se comporte comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge. Ses propriétés dépendent du pH du milieu. Le chitosane acido-solubilisé devient cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6.3 [48]. A un pH supérieur à 6.5, les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane précipite. Autour de pH 6, le nombre de fonctions amine libres devient suffisamment élevé pour induire une association des chaînes et la précipitation du polymère. On peut conclure que la solubilité du chitosane n'est pas facile et dépend de beaucoup de paramètres qui sont parfois difficilement maîtrisables.

III. Domaines d'application du chitosane

Les principales applications du chitosane sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : principales applications du chitosane [2]

Domaine d'application	Exemples d'applications
<ul style="list-style-type: none"> • pharmacie • dermatologie • chirurgie reconstructrice • ingénierie tissulaire • ingénierie biomédicale • biologie cellulaire • cancérologie • nutraceutique • dentisterie/chirurgie • ophtalmologie 	<p>Excipients, encapsulation et relargage (médicaments, gènes...)</p> <p>Produits dermatologiques (traitement de l'acné)</p> <p>Pansements, bandages, fils de sutures chirurgicaux biorésorbables</p> <p>Accélération de la cicatrisation et de la guérison des blessures</p> <p>Régénération osseuse et tissulaire (peau synthétique)</p> <p>Membrane de dialyse</p> <p>Encapsulation/immobilisation d'enzymes</p> <p>Introduction d'ADN exogène dans des cellules (transfection)</p> <p>Produits diététiques, amaigrissants (lutte contre l'obésité)</p> <p>Gel dentaire, implants dentaires</p> <p>Lentilles de contacts, liquides ophtalmiques</p>
<p>Agroalimentaire</p> <ul style="list-style-type: none"> • alimentaire • emballages 	<p>Additifs (liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant, de conservation)</p> <p>Restructuration des purées de fruits, de légumes ou de viande</p>

	<p>Stabilisation de la couleur et des arômes</p> <p>Clarification et désacidification des liquides alimentaires</p> <p>Préservation des aliments (anti-bactérien, antioxydant)</p> <p>Extraction du fer (mauvaise odeur dans les viandes)</p> <p>Support d'immobilisation d'enzymes ou de cellules (fromagerie, domaine diététique, aquaculture)</p> <p>Emballages biodégradables (comestibles)</p>
<p>Agriculture</p> <ul style="list-style-type: none"> · agricole · animale 	<p>Enrobage de semences (encapsulation)</p> <p>Immobilisation cellulaire (horticulture)</p> <p>Fongicide (« bio-pesticide »)</p> <p>Fertilisant, protection des cultures, traitement des sols</p> <p>Augmentation des rendements</p> <p>Films biodégradables (protection des récoltes, des feuillages)</p> <p>Alimentation animale</p> <p>Vaccination animale</p>
<p>Cosmétique</p>	<p>Ingrédient dans les formulations (stabilisant, fongicide...)</p> <p>Crèmes de soins, hydratantes, cicatrisantes</p> <p>Soins revitalisants, régénérants, amincissants, anti-âge</p> <p>Lotions, shampoings, produits de rinçage, démêlants</p> <p>Produits déodorants, laques, aérosols, filtres solaires vernis à ongles</p> <p>Articles de toilette (emballages)</p>
<p>Autres domaines</p> <ul style="list-style-type: none"> · chimie · biotechnologie · papeterie · textile · photographie · oenologie · acoustique 	<p>Catalyse</p> <p>Capteurs chimiques</p> <p>Super-absorbants</p> <p>Cristaux liquides</p> <p>Immobilisation des cellules et des enzymes</p> <p>Membranes</p> <p>Additifs pour pâtes à papiers</p> <p>Agent antibactérien et imperméabilisant dans la filière textile</p> <p>Films photographiques, extraction de l'argent</p> <p>Clarification, désacidification et stabilisation des vins</p> <p>Traitement préventif ou curatif des vignes</p> <p>Membrane des haut-parleurs</p>

CHAPITRE II

***EXPLOITATION DES CRUSTACES (CREVETTES) EN
VU DE LA PREPARATION ET LA CARACTERISATION
DE LA CHITINE ET LE CHITOSANE***

Partie I: Exploitation des crustacés (crevettes) en vu de la préparation de la chitine et du chitosane

I. collecte et traitement des crevettes

Dans cette étude nous avons utilisé les carapaces de crevette locale collectées des restaurants et pêcheries au niveau de la ville de Mostaganem. Ces crevettes sont généralement pêchées dans la zone de l'Ouest Algérien.



Figure 1: un échantillon de crevette rouge.

1. Prétraitement des carapaces de crevette

Avant l'utilisation des carapaces de crevette nous les avons nettoyés soigneusement à l'eau du robinet pour éliminer tous les résidus des protéines, tissus, matières organiques solubles, substances inorganiques et autres impuretés intactes. Ensuite nous les avons fait bouillir dans de l'eau pendant 1 heure pour éliminer les tissus adhérents. Les carapaces obtenues ont été séchées au four à 100 °C pendant 2 heures.

Les carapaces nettoyées sèches ont été broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur à café.



(A)



(B)

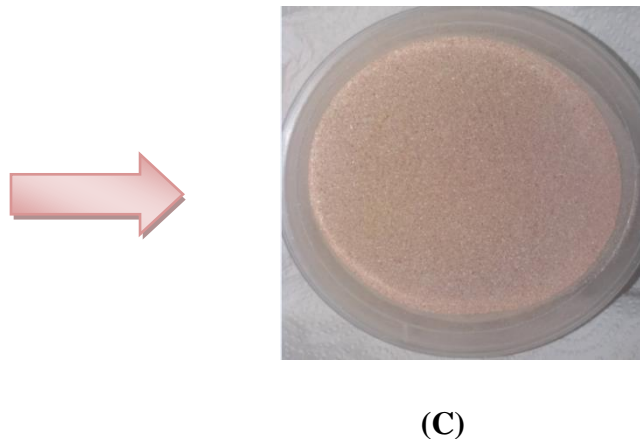


Figure 2 : (A) carapace de crevette nettoyée ; (B) carapace de crevette séchée ;
(C) la poudre des carapaces de crevette

2. *Extraction de la chitine*

A. *Produits chimiques utilisés*

Tableau 1: Produits chimiques utilisés dans l'extraction de la chitine

Produit chimique	Acide chlorhydrique	Hydroxyde de Sodium	Peroxyde d'hydrogène
Formule chimique	HCl	NaOH	H ₂ O ₂
Masse moléculaire (g/mol)	36.5	40	34.01
Densité	1.18	-	1.11
Pureté %	35-37	98	30

B. *matériel utilisé*

Pour l'extraction de la chitine et le chitosane nous avons eu besoin du matériel suivant :

- Agitateur magnétique
- Barreau aimanté
- PH-mètre
- Etuve
- Balance analytique
- Becher, Büchner, papier filtre.

2.1. Déminéralisation

Comme il a été déjà mentionné dans l'étude bibliographique, cette étape consiste à éliminer par un traitement acide les carbonates de calcium et les chlorures de calcium présents dans la chitine.

Dans un bécher de 500 ml on mélange une quantité de carapaces de crevette broyées et 250 ml d'une solution d'HCl 1M selon un ratio solide/liquide 1:5 (m/v), avec une agitation constante à température ambiante pendant 2 heures. Afin de solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium, la plupart des autres minéraux présents réagissent de façon similaire et donnent des sels solubles dans l'eau en présence d'acide.



Après réaction on procède à la filtration en transvasant le contenu du bécher dans un büchner munit d'un papier filtre et disposé sur une fiole à vide.

On poursuit par un lavage avec l'eau distillée cinq fois. En tenant compte de l'excès de l'acide on neutralise notre échantillon en y ajoutant quelques millilitres d'une solution de NaOH (1 M) à l'eau de lavage jusqu'à obtenir un pH neutre. On sèche la poudre obtenue dans l'étuve à 80°C pendant 24 heures.

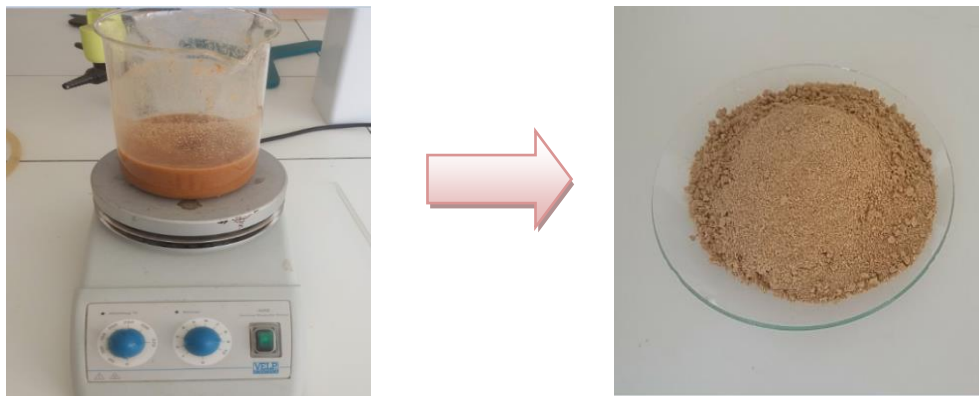


Figure 3 : la déminéralisation de la poudre des carapaces

2.2. Déprotéinisation

Cette étape consiste à éliminer les protéines adhérentes à la chitine.

On introduit la poudre séchée dans un bécher de 500 ml avec une solution alcaline NaOH 1.5M selon un ratio solide/liquide de 1:10 (m/v), avec une agitation constante à température ambiante pendant 2 heures.

On effectue une filtration sous vide et un lavage avec de l'eau distillée cinq fois en neutralisant l'échantillon avec quelques millilitres d'une solution acide d'HCl 1M pour éliminer l'excès du réactif. La poudre est séchée dans l'étuve à 80°C pendant 24 heures.

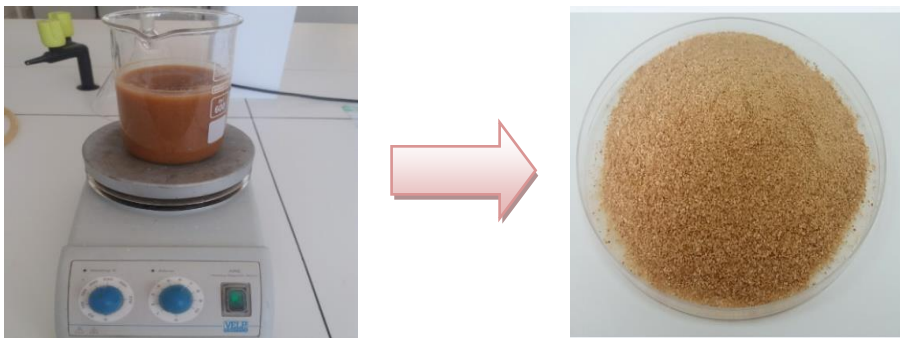


Figure 4 : la déprotéinisation de la poudre des carapaces

2.3. Décoloration

Cette étape consiste à éliminer les pigments dans les carapaces de crevette qui forment des complexes avec la chitine, telles que les dérivés de β -carotène.

Afin d'obtenir une chitine blanche, la matière sèche est traitée avec un agent oxydant qui est le peroxyde d'hydrogène à une concentration de 20 % selon un ratio solide/liquide 1:10 (m/v), sous agitation magnétique durant 30 mn.

On filtre et on lave plusieurs fois avec l'eau distillée pour éliminer les composants restants afin d'obtenir un milieu neutre.

La chitine est ensuite séchée à l'étuve à une température de 60 °C pendant 24 heures.



Figure 5 : l'aspect de la chitine pure après décoloration

- Après chaque étuvage, la matière sèche est pesée pour déterminer le rendement de chaque réaction.

❖ **Test de Biuret**

Après avoir déprotéiné et décoloré la chitine, nous avons effectué ce test de biuret pour s'assurer de l'efficacité de la déprotéinisation.

Le nom de la méthode vient du fait que le 'biuret' est la plus petite molécule qui puisse réagir pour ce test caractéristique [49].

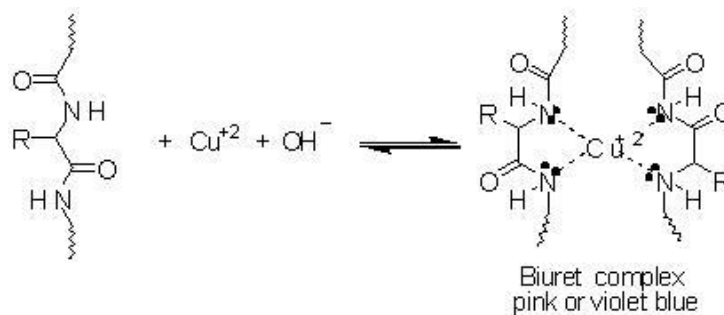


Figure 6 : la formation du complexe biuret

Cette réaction caractérise la liaison peptidique ; elle s'applique donc à l'analyse qualitative des protéines et des peptides (à condition que ces derniers comportent au moins quatre acides aminés afin d'obtenir trois liaisons peptidiques).

Protocole :

A une masse de chitine, on ajoute quelques millilitres d'hydroxyde de sodium (Na^+ , OH^-) à (0,1M) et quelques millilitres de sulfate de cuivre (Cu_2^+ , SO_4^{2-}) à (1%) dans un tube à essai. On fait le même test avec les carapaces de crevette broyées pour voir la différence.

Le test est positif lorsqu'une couleur violette (ou rose) apparaît. Elle est due à la formation d'un complexe entre les ions de cuivre et les liaisons peptidiques [49].

Et si le test est négatif alors une coloration bleue apparaît ; c'est la formation de l'hydroxyde de cuivre.

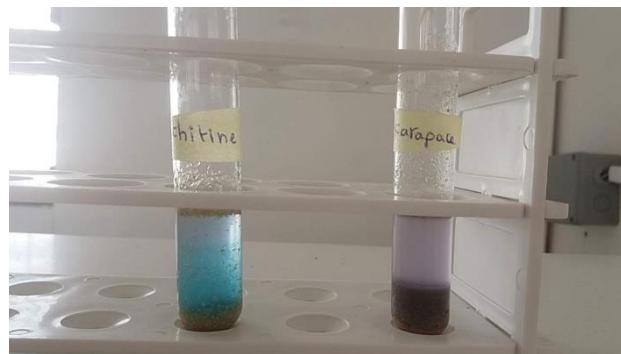


Figure 7 : test de biuret négatif à gauche pour la chitine et positif à droite pour les carapaces de crevette

3. Préparation du chitosane par désacétylation de la chitine

C'est l'étape la plus délicate qui met en œuvre la substitution d'un nombre maximal et suffisant de groupements acétyles pour aboutir au chitosane. La désacétylation est généralement réalisée par le traitement de la chitine avec l'hydroxyde de sodium (NaOH) concentré.

- A fin d'obtenir des chitosanes avec différent degré de désacétylation nous avons traité la chitine pure avec des solutions de NaOH à différentes concentration (10%, 20%, 30%, 40%), pendant différentes périodes de temps (1h, 5h, 17h, 24h).

Pour chaque réaction de désacétylation on ajoute dans un bécher de 100 ml la chitine pure et la solution de NaOH selon un ratio solide/liquide 1:5 (m/v) avec une agitation constante à température ambiante pendant des intervalles de temps différents pour chaque concentration.

- Nous avons aussi préparé un autre chitosane avec une solution NaOH de 50% de concentration.

Dans un bécher on ajoute une quantité de chitine et la solution de NaOH selon un ratio solide/liquide 1:10 (m/v). On met le bécher dans un bain marie préparé préalablement à une température de 90°C avec une agitation constante pendant 50 min. Après chaque traitement le produit obtenu est filtré, lavé avec de l'eau distillée jusqu'à neutralisation (l'eau de lavage doit avoir un pH neutre) et finalement séché à 60°C pendant 20 heures.

- Après chaque séchage, le produit sec est pesé pour déterminer le rendement de chaque réaction.

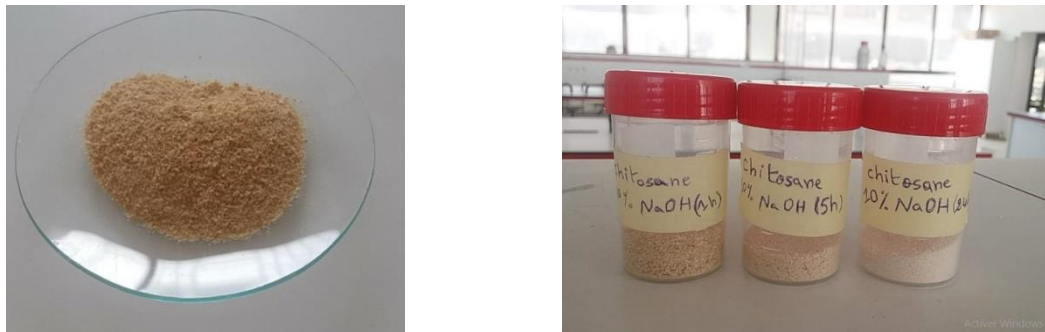


Figure 8 : différents échantillons de chitosane après désacétylation

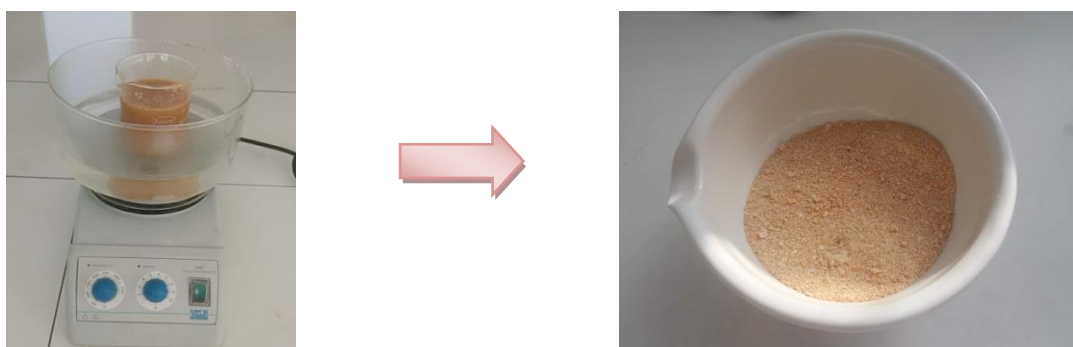


Figure 9 : chitosane obtenu par désacétylation de la chitine à 90°C pendant 50 min

II. *Résultat et Discussion*

1. *Rendement des réactions*

1.1. *Extraction de la chitine*

Pour extraire la chitine à partir des déchets de crevette, on a utilisé une quantité de 50 g de poudre sèche, qui a été traitée avec une solution d'acide chlorhydrique (1M) pendant 2 h sous agitation continue, à la température ambiante pour éliminer les composés minéraux (déméralisation) qu'elle contient.

Ensuite, on a continué l'extraction avec une solution alcaline d'hydroxyde de sodium à (1.5M) pendant 2h et à la température ambiante, pour dissocier le complexe chitine-protéines (déprotéinisation).

Par la suite, on a décoloré l'échantillon avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 20% durant 30 mn à une température ambiante. Cette étape sert à éliminer les substances colorantes qui sont les dérivés de β -carotène. On obtient à la fin du traitement une poudre de la chitine pure.

$$\text{Rendement} = \frac{\text{masse de l'échantillon avant le traitement}}{\text{masse de l'échantillon après le traitement}} \% \dots\dots\dots \text{Eq II.1}$$

Tableau 2: Rendement des différentes étapes d'extraction de la chitine

Traitement	Déméralisation	Déprotéinisation	décoloration
Rendement %	68.89%	80.37%	94.36%

Le rendement global du processus d'extraction de la chitine = 52.24%

D'après les rendements calculés, on remarque une perte de masse importante après chaque traitement ce qui peut être expliqué par la solubilisation des sels minéraux présents dans la composition des carapaces de crevette et la dissociation du complexe chitine-protéine (Chitinoprotéine), ainsi que l'élimination des pigments tel que les dérivés de β -carotène

Ces résultats nous confirment l'efficacité des traitements d'isolation de la chitine

Le temps de réaction a aussi un effet important sur l'efficacité d'extraction. Plus on augmente l'intervalle de temps, plus on assure la pureté de la chitine. Mais comme il a déjà été

mentionné dans la bibliographie, les conditions drastiques peuvent conduire à la dépolymérisation ou la dégradation du polymère.

1.2. Extraction du chitosane

- Pour préparer le chitosane, 5 g de la chitine a été désacétylée par une solution de l'hydroxyde de sodium de différentes concentrations pendant différentes périodes de temps à température ambiante. Cette combinaison de paramètres nous a permis d'obtenir 16 échantillons différents de chitosane.
- Un autre échantillon de chitosane a été préparé par désacétylation de 11g de la chitine par une solution alcaline de l'hydroxyde de sodium à 90 °C pendant 50 mn.

❖ Efficacité des traitements

Tableau 3 : Rendement de la chitine désacétylée à 10% NaOH

Traitement (h)	10 %_1h	10 %_5h	10 %_17h	10 %_24h
Masse du chitosane (g)	4.12	3.07	3.20	3.43
Rendement (%)	83.8	60.8	64	68.6

Tableau 4 : Rendement de la chitine désacétylée à 20% NaOH

Traitement	20 %_1h	20%_5h	20 %_17h	20 %_24h
Masse du chitosane (g)	3.96	2.97	2.74	3.27
Rendement (%)	79.2	59.4	54.8	65

Tableau 5 : Rendement de la chitine désacétylée à 30% NaOH

Traitement	30 %_1h	30 %_5h	30 %_17h	30 %_24h
Masse du chitosane (g)	4.03	3.48	1.97	2.29
Rendement (%)	80.6	69.6	39.5	45.8

Tableau 6: Rendement de la chitine désacétylée par 40 % NaOH

Traitement	40%_1h	40%_5h	40%_17h	40%_24h
Masse du chitosane (g)	3.35	3.22	2.13	2.61
Rendement (%)	67.1	64.5	42.6	52.2

Tableau 7 : Rendement de la chitine désacétylée par 50% NaOH à 90°C pendant 50mn

Masse de la chitine désacétylée (g)	11
Masse du chitosane obtenu (g)	3.22
Rendement (%)	29.27

D'après les résultats présentés dans les tableaux 3 à 7, on constate que cette transformation chitine – chitosane enregistre un rendement en chitosane relativement faible surtout quand le temps de réaction et la concentration en NaOH sont élevés. A titre d'exemple, quand on double la concentration de la soude de 20 à 40 % et qu'on maintient la même durée de réaction, le rendement en chitosane chute de 79 à 67 %. D'autres parts, une augmentation du temps de réaction de 1h à 24h pour une même concentration de NaOH de 30 %, par exemple, le rendement en chitosane a baissé de 80 à 45 %. Ceci est probablement dû à une transformation indésirable et non contrôlée d'une partie de la chitine. On peut penser que cette transformation est une dépolymérisation donnant lieu à la formation d'entités polymériques de faible masse moléculaire qui se dissout dans le milieu réactionnel. Nous ne nous sommes pas attelés à identifier ces substances qui nécessitent des techniques de séparations très poussées comme la chromatographie par exemple.

III. Conclusion

A partir des résultats obtenus et comme il a déjà été rapporté ultérieurement par beaucoup de scientifiques on peut confirmer que les conditions de réaction soit le temps, la température ou la concentration de la solution alcaline utilisée influent sur la désacétylation de la chitine et par conséquent sur le degré de désacétylation du chitosane obtenu.

Et comme nous l'avons déjà mentionné des conditions drastiques de traitement peuvent conduire à la dégradation d'au moins une partie du polymère.

Partie II : caractérisation de la chitine et du chitosane

I. Introduction

Pour la caractérisation de la chitine et les échantillons du chitosane préparés nous avons choisi la spectroscopie infrarouge par transformée de fourrier (FTIR) et le potentiomètre ou le dosage pH-métrique. Ces deux méthodes nous ont permis de calculer le degré de désacétylation du chitosane. Comme la solubilité du chitosane n'est pas parfaite, la potentiométrie a été prise à titre indicatif et une comparaison des deux méthodes étaient nécessaires.

1. Spectroscopie Infrarouge Par Transformée de Fourier (FTIR)

1.1. Principe

La spectrométrie IR constitue une méthode de choix pour l'analyse à la fois qualitative et quantitative des substances chimiques. Elle permet de connaître les différents groupements fonctionnels présents dans une molécule. Elle est basée sur l'absorption des photons « $h\nu$ » émis par une radiation très peu énergétique, permettant de modifier l'énergie de vibration des molécules. L'infrarouge est une méthode spectroscopique non destructive vis-à-vis de l'échantillon analysé. Le spectre IR est étudié dans une gamme de fréquence allant de 400 à 4000 cm^{-1}

1.2. Méthode de préparation de l'échantillon

La méthode la plus simple et la plus rapide pour calculer le degré DDA est la spectroscopie IR comme déjà proposée par *Khan et al. (2000)* [50].

L'appareil utilisé pour cette analyse est IR-Prestige 21 SHIMADZU du laboratoire de Structure, Elaboration et Application des Matériaux Moléculaires (SEA2M), Faculté des Sciences Exactes et de l'Informatique (FSEI)- Université de Mostaganem.

Pour préparer la pastille, une quantité de 0.995 g de KBr (bromure de potassium) et 0.001g de l'échantillon désiré sont broyés dans un mortier pour avoir une poudre fine. Le mélange est déposé dans un moule, puis compacté sous pression dans une presse hydraulique. Il est ensuite extrait du moule sous la forme de pastille.

Le porte-échantillon contenant la pastille KBr/produit est placé dans le compartiment de mesure de l'appareil sur le trajet du faisceau IR incident.

Pour chaque test nous avons collecté 16 balayages ou scans à une résolution de 2 cm^{-1} .

2. Dosage pH-métrique ou potentiométrique

2.1. Principe

Dosage pH-métrique, ou le titrage par suivi pH-métrique, est utilisé pour déterminer la concentration inconnue d'une solution composée d'un acide ou d'une base. Si la solution de titre inconnu est un acide, on lui ajoute une base de façon à neutraliser l'acide ; l'intérêt étant de déterminer précisément la quantité de base ajoutée pour neutraliser l'acide.

Il existe deux méthodes

- l'utilisation d'un indicateur coloré (volumétrie colorimétrique non-instrumentale),
- le tracé de la courbe qui donne le pH en fonction du volume de la base ajouté (volumétrie instrumentale)

Le même principe est utilisé pour déterminer le titre d'une solution de base de concentration inconnue : on utilise alors une solution acide pour effectuer le titrage.

2.2. Méthode du dosage des échantillons

Le dosage pH-métrique s'effectue selon la méthode de *Tolaimate et al.1999* [51].

- ✓ Solubilisation de 150 mg de l'échantillon à étudier dans 10 ml de HCl à 0,1 N ;
- ✓ Ajustement du volume de la solution à 200 ml avec de l'eau distillée;
- ✓ Titrage de la solution, sous agitation constante, avec une solution de NaOH à 0,1N ;
- ✓ Mesure du pH de la solution après chaque ajout de 0,5 ml de NaOH.

Ce dosage pH-métrique nous donne une courbe présentant deux points d'inflexions. Ces points sont identifiables graphiquement. Ils correspondent à la variation de la deuxième dérivée. Dans ce dernier cas, la courbe intercepte l'axe des volumes V (NaOH) en deux points. La différence de volume de NaOH entre ces deux points correspond à la quantité d'acide chlorhydrique nécessaire pour protoner les groupements aminés du chitosane.

II. Calcul du degré de désacétylation (DDA) du chitosane

Le degré de désacétylation (DDA%) représente une caractéristique essentielle de la chitine et du chitosane. Il représente la fraction d'unité glucosamine par rapport au nombre total d'unités et c'est grâce à cette désacétylation que le chitosane devient soluble après protonation des amines présentes

1. Par spectroscopie IR (FTIR)

L'analyse infrarouge permet de distinguer les bandes d'absorption caractéristiques des principales fonctions chimiques présentes dans la chitine et le chitosane.

La figure (10) montre le spectre IR de la chitine pure et le tableau 1 regroupe les principales bandes caractéristiques identifiées à partir de ce spectre.

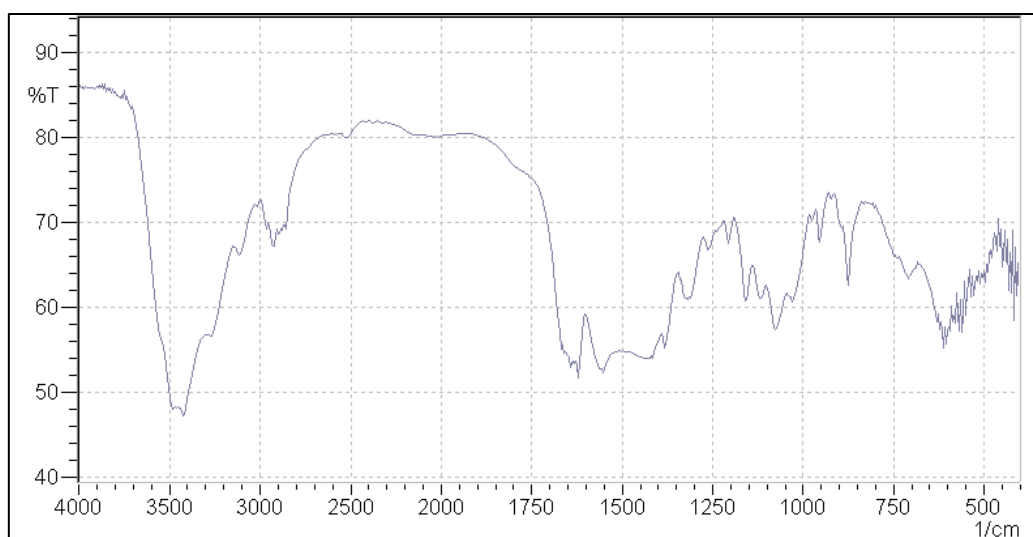


Figure 10 : spectre infrarouge de la chitine pure

Tableau 8 : les bandes caractéristiques de la chitine

<i>Nombre d'onde cm⁻¹</i>	<i>Intensité</i>	<i>Attribution</i>
3400-3500	Forte	O-H lié (élongation)
3100-3350	Forte	N-H libre (élongation)
2700-2900	Forte	CH ₃ (élongation symétrique)
1550	Forte	N-H amide II déformation dans le plan
1650	Forte	C=O amide I (élongation)
1320	Faible	C-N amide III
1050	Forte	C-O-C (élongation)
970	Forte	C-O (élongation)

Caractérisation et calcul de DDA des différents échantillons de chitosane

Les spectres infrarouges du chitosane sont regroupés selon la concentration de la soude caustique utilisée en variant le temps des réactions. Dans les figures 2 à 6 sont présentés les 4 spectres obtenus.

Le tableau 2 présente les bandes caractéristiques principales des échantillons de chitosane.

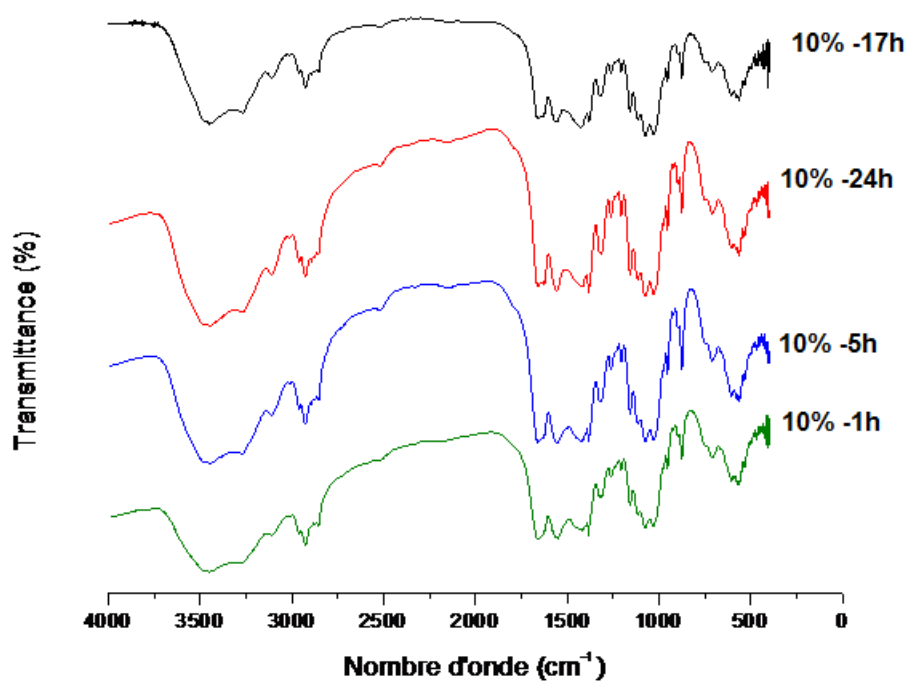


Figure 11: spectre infrarouge du chitosane désacétylé a 10% NaOH durant différentes périodes de temps

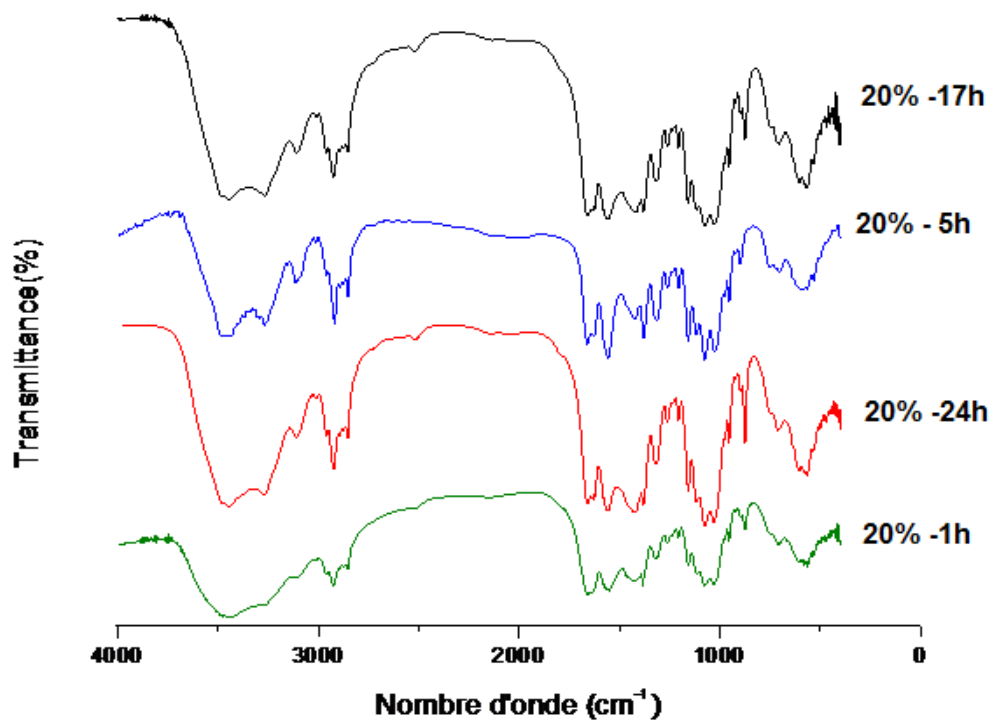


Figure 12: spectre infrarouge du chitosane désacétylé a 20% NaOH durant différentes périodes de temps

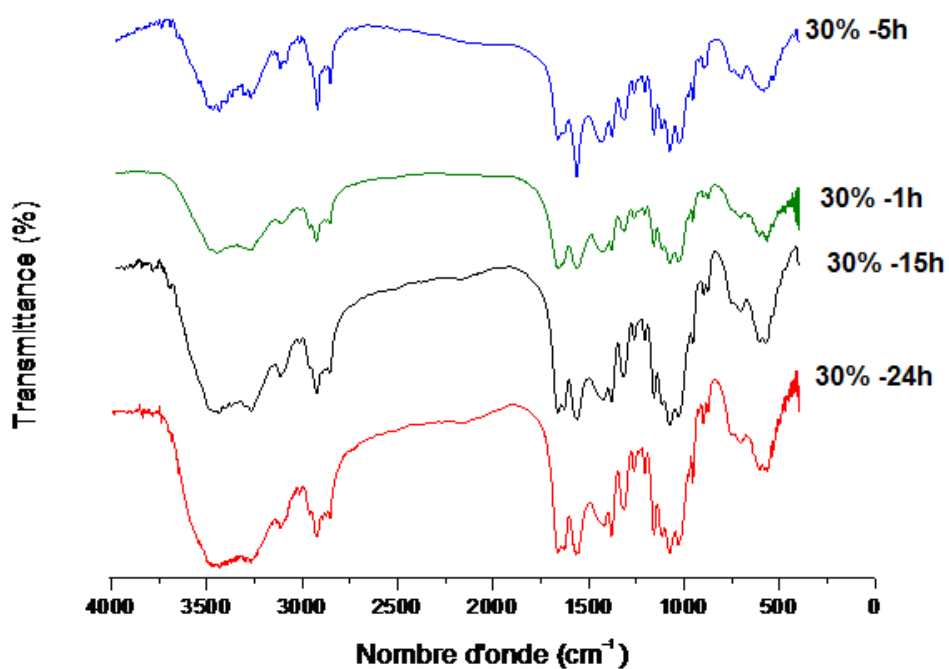


Figure 13: spectre infrarouge du chitosane désacétylé à 30% NaOH durant différentes périodes de temps

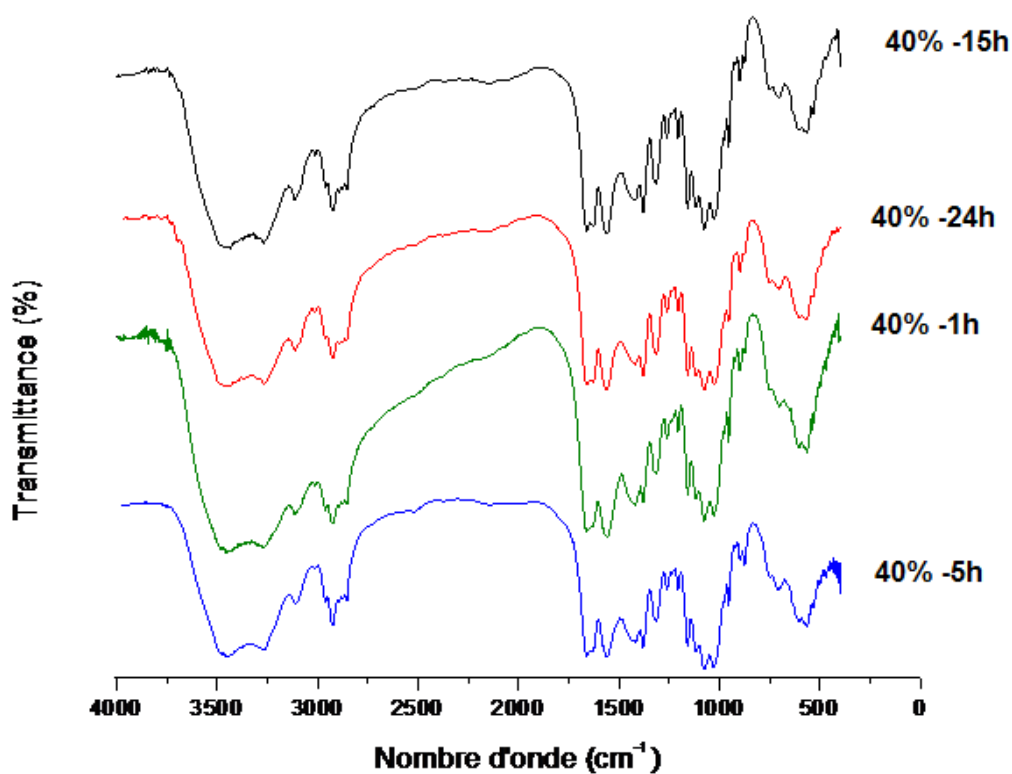


Figure 14: spectre infrarouge du chitosane désacétylé à 40% NaOH durant différentes périodes de temps

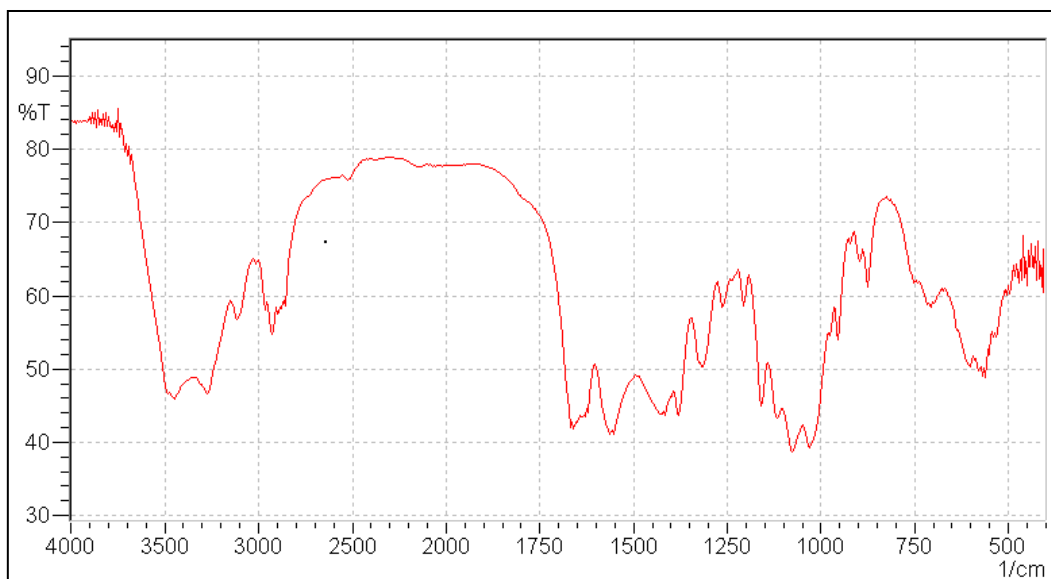


Figure 15: spectre IR désacétylé à 50% NaOH pendant 50 mn à 90°C

Tableau 9 : les bandes caractéristiques du chitosane

<i>Nombre d' onde cm^{-1}</i>	<i>Intensité</i>	<i>Attribution</i>
3450-3500	Forte	O-H lié (élongation)
3200-3400	Forte	N-H libre (élongation)
2850-2950	Forte	CH ₃ (élongation symétrique)
1560	Forte	N-H amide II déformation dans le plan
1650	Forte	C=O amide I (élongation)
1150	Forte	C-O-C (élongation)
970	Forte	C-O (élongation)
1360	Forte	O-H (déformation)
1075	Forte	C-O (déformation)

On remarque que l'intensité des pics IR des bandes caractéristique augmente en fonction du temps. A titre d'exemple sur les pics à 1650 cm^{-1} et 1320 cm^{-1} (figure 2) du chitosane désacétylé à 10%-1h et celui désacétylé à 10%-24h, respectivement, on remarque que l'intensité du pic augmente légèrement en augmentant le temps de réaction. Elle augmente aussi légèrement en augmentant la concentration de la soude (comparer sur la figure 6 chitosane désacétylé à 10%-1h et celui désacétylé à 30%-1h d'une part, et d'autres parts le chitosane désacétylé à 10%-1h et celui à 50%-50 mn).

L'existence de la bande caractéristique amide I (C=O) est due à la désacétylation partielle de la chitine. Il faut noter qu'il reste toujours de 10 à 15 % de groupements acétyle dans la chaîne polymérique selon les degrés de désacétylation déterminés par la méthode FTIR.

Il existe d'autres méthodes, rapportées dans la littérature, pour déterminer le DDA du chitosane. Les plus utilisées sont basées sur l'électrochimie, la RMN ¹H et la spectrophotométrie UV [2]. La contrainte majeure rencontrée par ces techniques est la solubilité des matériaux en milieu aqueux. Pour pallier à cet inconvénient, on peut utiliser la RMN du solide qui ne permet de déterminer le DDA que dans un domaine limité ou la spectroscopie infrarouge qui permet la caractérisation des échantillons quel que soit leur DDA. C'est cette dernière technique que nous avons adoptée pour caractériser les échantillons de chitosane.

Nous nous sommes basés sur la méthode de *Brugnerotto et al. 2001* [42] qui permet de calculer le degré de désacétylation d'un chitosane en déterminant le rapport des bandes d'absorption respectivement à 1320 et 1420 cm⁻¹.

Le pic à 1320 cm⁻¹ est caractéristique de la fonction amine acétylée ou amide tandis que celui à 1420 cm⁻¹ est choisi comme pic de référence et qui correspond à la déformation symétrique de CH₃ et CH₂ qui ne devrait pas changer si le matériau ne subit pas une détérioration.

L'équation proposée pour calculer le DDA est la suivante :

$$DDA = 100 - \frac{(A_{1320}/A_{1420}) - 0.3822}{0.03233} \dots\dots\dots \text{Equ II.2}$$

Les résultats des calculs effectués sont regroupés dans le tableau 3 qui résume les DDA du chitosane déterminé par FTIR et pH-métrie.

2. Par méthode de pH-métrie

Les courbes de dosage pH-métrique sont regroupées dans les figures (7-10). Cette méthode est utilisée pour comparer les DDA obtenus par FTIR.

Les courbes présentent deux points d'inflexion. Le premier point d'inflexion correspond au volume de la soude nécessaire pour neutraliser l'acide HCl en excès (V1) et le second à la neutralisation de l'acidité totale du milieu (V2). La différence des volumes de NaOH entre ces deux points (V2 - V1) correspond à la quantité de NaOH nécessaire à la neutralisation des

fonctions ammonium du chitosane. Le volume de NaOH est déterminé graphiquement. Le DDA est calculé par l'équation suivante :

$$DDA = 100 - \left[\frac{2.03 \cdot (V_2 - V_1)}{m + 0.0042 \cdot (V_2 - V_1)} \right] \dots \dots \dots \text{Eq II.3}$$

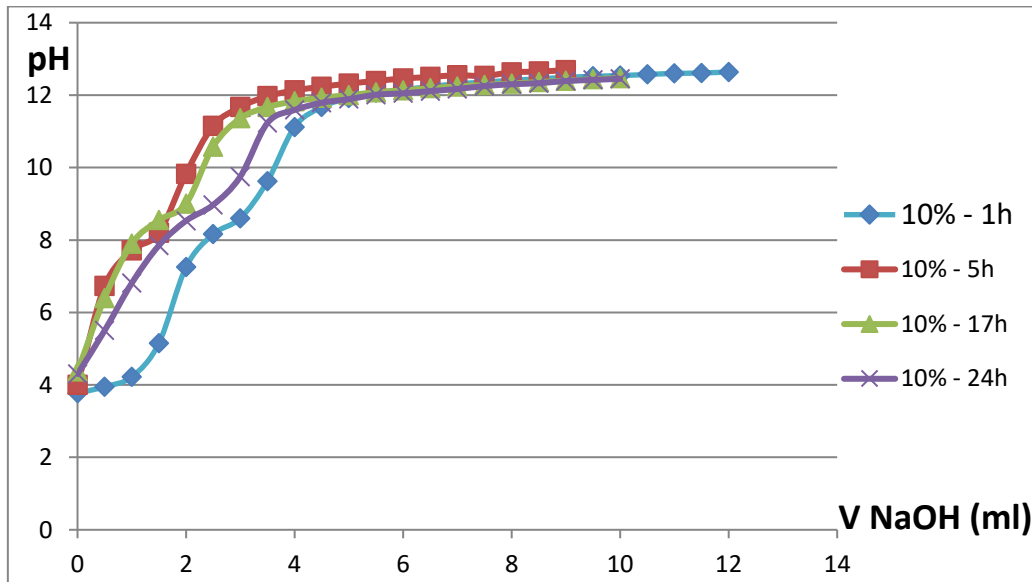


Figure 16 : dosage pH-métrique du chitosane désacétylé à 10% NaOH

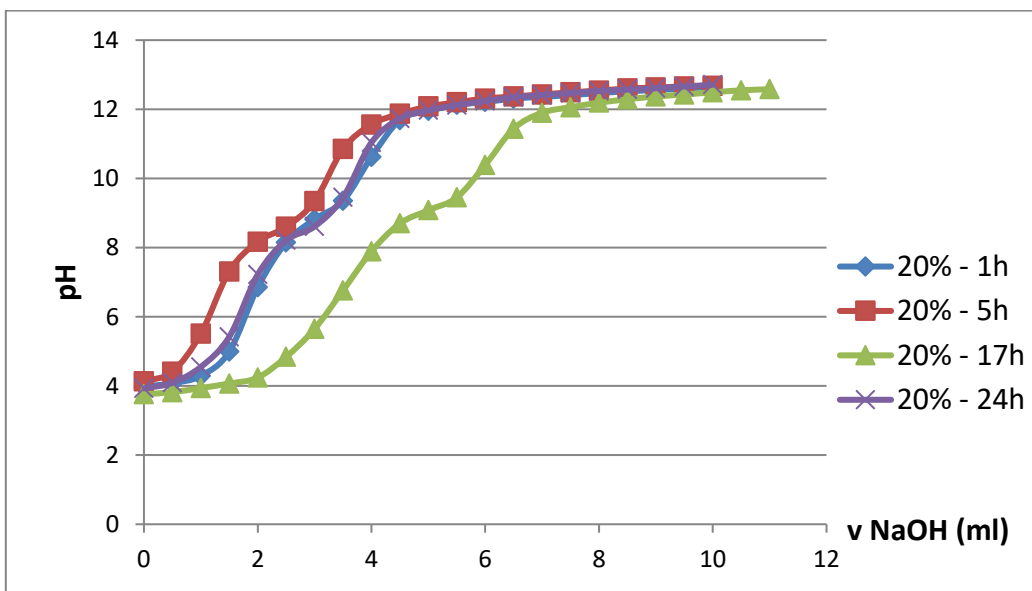


Figure 17 : dosage pH-métrique du chitosane désacétylé à 20% NaOH

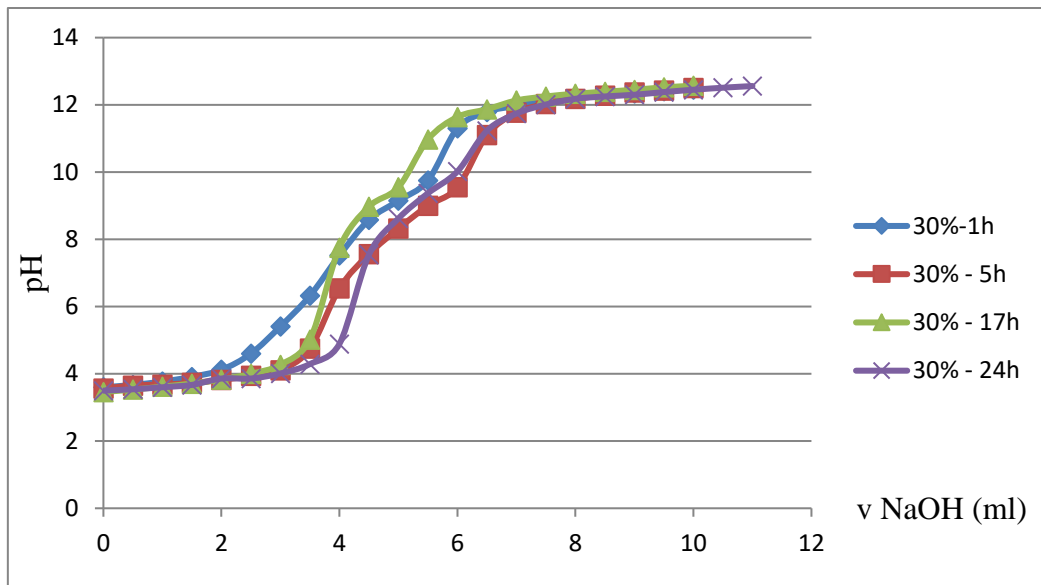


Figure 18 : dosage pH-métrique du chitosane désacétylé à 30% NaOH

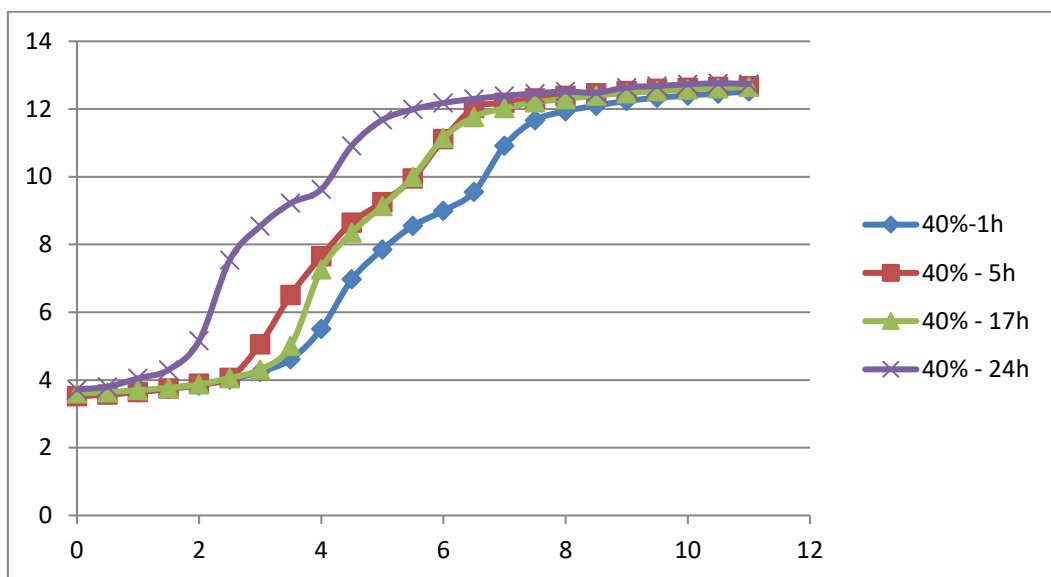


Figure 19 : dosage pH-métrique du chitosane désacétylé à 40% NaOH

Tableau 10 : DDA du chitosane désacétylé à 10% NaOH

Temps de réaction (h)	1	5	17	24
Méthode FTIR				
DDA%	86,8	88	87,5	86,75
Méthode pH-métriques				
DDA%	71,95	88,11	93,32	94,64

Tableau 11 : DDA% du chitosane désacétylé à 20% NaOH

Temps de réaction (h)	1	5	17	24
Méthode FTIR				
DDA %	85,69	84,66	86,72	91,5
Méthode pH-métrique				
DDA %	73,15	70,75	67,20	73,15

Tableau 12 : DDA du chitosane désacétylé à 30% NaOH

Temps de réaction (h)	1	5	17	24
Méthode FTIR				
DDA %	87,48	85,22	83,71	82,3
Méthode pH-métrique				
DDA %	73,15	67,20	79,27	76,80

Tableau 13 : DDA% du chitosane désacétylé à 40% NaOH

Temps de réaction (h)	1	5	17	24
Méthode FTIR				
DDA %	84,11	83,4	82,18	81,95
Méthode pH-métrique				
DDA %	63,70	70,67	74,36	76,80

Tableau 14 : DDA du chitosane désacétylé à 50 % NaOH

50% - 50min - 90° C	
DDA	
FTIR	86,20
pH-métrie	-

On remarque qu'il y a une différence entre les DDA des échantillons du chitosane déterminés par la méthode FTIR et la méthode de pH-métrie. En effet, avec FTIR on utilise du chitosane solide (poudre) et en pH-métrie on le solubilise dans de l'acide HCl, et comme nous avons déjà mentionné la solubilité du chitosane n'est pas totale, une partie des groupements amine reste confinée et donc inaccessible à la réaction. La spectroscopie reste toutes fois plus

proche de la réalité du chitosane que la pH-métrie. Mais la différence n'est pas énorme entre les deux techniques.

Nous avons choisi quatre concentrations de NaOH et quatre différentes périodes de temps et nous avons travaillé à température ambiante pour étudier l'influence du temps et de la concentration de la solution alcaline sur la désacétylation du chitosane et par conséquent sur le DDA du chitosane.

On remarque que la concentration de l'hydroxyde de sodium a influencé légèrement les DDA du chitosane. A titre d'exemple le chitosane désacétylé à (10% - 24h) et celui à (20% - 24h) ou le chitosane désacétylé à (10% - 1h) et celui à (30% - 1h), le DDA a augmenté en augmentant la concentration.

De même le DDA augmente en augmentant le temps de réaction. Cette tendance est visible en comparant les échantillons le chitosane désacétylé à (20% - 1h) et à (20% - 24h) ou encore le chitosane préparé à (10% - 1h) et à (10% - 5h).

III. Conclusion

On peut conclure à partir des résultats obtenus que la réaction de désacétylation du chitosane dépend de trois facteurs, la concentration du milieu alcalin, le temps de la réaction et la température à laquelle se fait la réaction. L'augmentation de ces facteurs augmente le DDA du chitosane.

Comme on peut conclure aussi que la meilleure méthode de caractérisation de la chitine et le chitosane et la plus précise reste la spectrophotométrie infrarouge (FTIR).

CHAPITRE III
ETUDE DE LA SOLUBILITE DU CHITOSANE

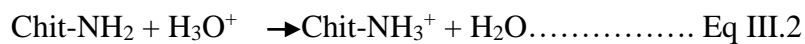
I. Introduction :

Le chitosane peut se solubiliser dans des solutions acides ($\text{pH} < 6,0$), mais est insoluble dans l'eau, les solvants organiques et les bases aqueuses. En effet, le chitosane est une base forte et possède des groupes d'amines primaires avec un pKa égal à 6,3. À cause de la présence des groupes amines, la charge et les propriétés du chitosane vont varier avec le pH [48].

Lorsque le pH est faible, les amines subissent une protonation et deviennent chargées positivement, le chitosane devient alors un polyélectrolyte cationique hydrosoluble. Il est d'ailleurs le seul polycation d'origine naturelle. D'un autre côté, lorsque le pH est élevé, le chitosane est insoluble. Cette transition entre soluble et insoluble du chitosane a lieu pour des pH compris entre 6 et 6,5 autour de la valeur du pKa . Le pKa étant fortement dépendant du degré de désacétylation, la solubilité du chitosane est aussi dépendante du DDA et de la méthode de désacétylation utilisée [52]. En effet, lorsque le DDA est faible, le chitosane est peu soluble car les groupes amines sont peu nombreux. Il est alors préférable d'utiliser un chitosane au DDA supérieur à 70 % pour avoir une solubilité minimale de celui-ci. La solubilité est aussi dépendante de la nature de l'acide utilisé, de la force ionique et de la distribution des groupes acétyle sur la chaîne macromoléculaire [29].

Lorsque le degré de protonation, qui est fonction de la concentration initiale de l'acide utilisé, augmente, la solubilisation du chitosane augmente. Celle-ci est complète pour un degré de protonation supérieur à 0,5 [2].

Le solvant le plus couramment utilisé pour la dissolution du chitosane est l'acide acétique en solution aqueuse. Les équations d'équilibre pour le chitosane dispersé dans une solution d'acide acétique sont :



II. *Expérimentation*

1. *Solubilité en fonction de la concentration et la température :*

Le test de solubilité est réalisé en préparant des solutions aqueuses de 0,15 g du chitosane avec 25 ml d'acide acétique aux concentrations % (5, 10, 20, 50, 100) et à différentes températures ($T = 25\text{ C}^\circ$ ambiante et $T = 50\text{ C}^\circ$). La solution est maintenue sous agitation magnétique pendant 5h.

La masse insoluble de chitosane a été filtrée et séchée à 50 C° dans l'étuve pendant 24 h et elle a ensuite pesée pour calculer le taux de solubilité

Les résultats sont illustrés dans les figures de 1 à 8

2. *Solubilité en fonction du DDA*

La densité des fonctions amine sur la chaîne polysaccharide, par conséquent le DDA, va donc beaucoup jouer sur la solubilité du chitosane. La tendance démontrée par Sorlier et coll [53]. sur une large gamme de DDA est que le pK intrinsèque du chitosane (pK_0) augmente lorsque la valeur de DDA augmente, et ce quelle que soit la valeur du degré de dissociation.

Pour expliquer ce phénomène, les auteurs avancent que l'hydrophobie apportée par les motifs acétylés augmente la 'cationicité' des groupements ammonium. Ainsi, lorsque le DDA augmente, le chitosane serait soluble sur une plus grande gamme de pH.

Nous avons choisis les échantillons du chitosane avec des degrés de désacétylation différents (84.11, 86.6, 88, 91) et nous avons préparé une solution de 0.15g de chitosane avec 0.25 ml de l'acide acétique à 50 % de concentration sous une agitation constante pendant 5 h. La masse insoluble est filtrée, séchée et pesée pour déterminer le taux de solubilité.

3. *Solubilité en fonction du pH*

Le chitosane est soluble dans les acides organiques faiblement dilués (comme l'acide acétique, lactique et citrique). Il se comporte ainsi comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge dont les propriétés dépendent du pH du milieu. Le chitosane est solubilisé et devient cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6,3 [53]. A un pH supérieur ($> 6,5$), les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane précipite. Autour de pH 6, le nombre de fonctions amine libres devient suffisamment élevé pour induire une association des chaînes et la précipitation du polymère.

On met 20 ml d'acide acétique dans 6 béchers et on ajoute dans chaque bécher NaOH jusqu'à obtenir des solutions où le pH est égale à 3, 4, 5, 6, 7 et 8. On ajoute ensuite une quantité de 0.1 g de chitosane. Les solutions sont maintenues sous agitation magnétique pendant 4h.

4. *Solubilité en fonction du taux de glycérol*

Le glycérol est un composé chimique de formule $C_3H_8O_3$ liquide incolore, visqueux et inodore au goût sucré et faiblement toxique. Il est utilisé dans de nombreuses compositions pharmaceutiques.

Pour le test de solubilité de chitosane on met dans des béchers 0,1g de chitosane dans des solutions d'acide acétique de 50 % de concentration avec des proportions différentes de glycérol (1%, 2%, 5%, 10%, 15%) et on maintient sous agitation magnétique pendant 4h.

La masse insoluble de chitosane a été filtrée, séchée à 60 C° dans l'étuve pendant 24h et pesée pour évaluer le taux de solubilité.

III. *Résultat et discussion*

1. *Solubilité en fonction de la concentration et la température de l'acide acétique*

L'étude de l'effet de la concentration, de la température de la solution de l'acide acétique sur la solubilité du chitosane, a été réalisée sur des solutions de l'acide à différentes concentrations en variant la température (à 25°C et à 50°C).

Les figures ci-dessous de (1 à 8) représentent le taux de solubilité des échantillons du chitosane, en fonction de la concentration des solutions d'acide acétique à 25 °C et à 50 °C.

Le taux de solubilité a été calculé par l'équation proposé par *Mohy Eldin et al* [55] :

$$\text{taux de solubilité} = 1 - \left[\frac{\text{poids de la fraction insoluble}}{\text{poids totale de l'échantillon}} \right] \% \dots\dots\dots \text{Eq III.1}$$

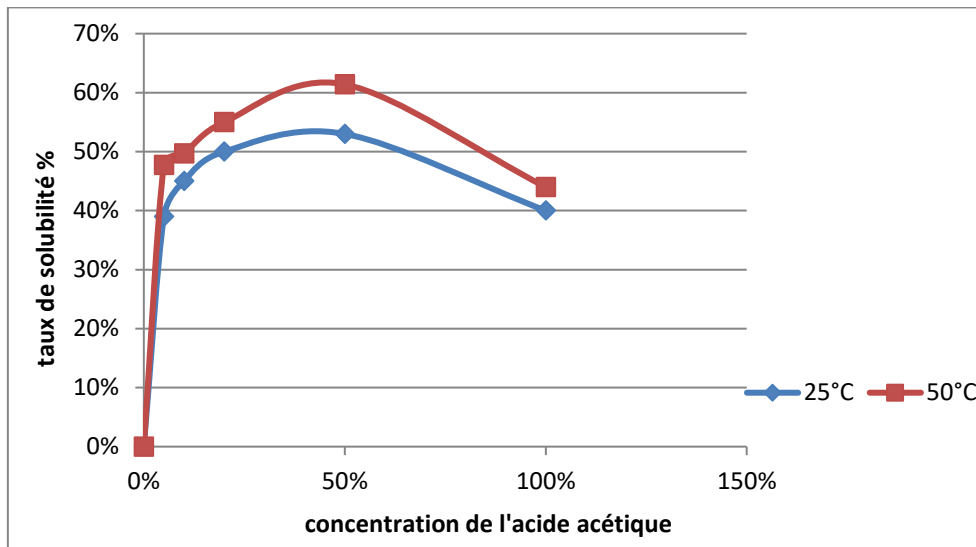


Figure 1 : taux de solubilité du chitosane de DDA= 86.8 % en fonction de la concentration de l'acide acétique et de la température

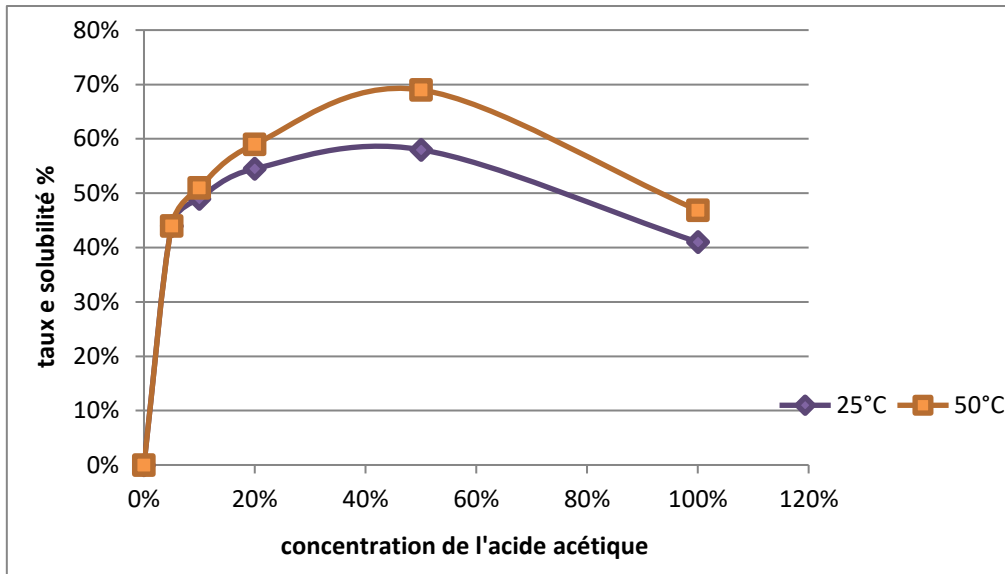


Figure 2 : taux de solubilité du chitosane de DDA = 88 % en fonction de la concentration de l'acide acétique et de la température

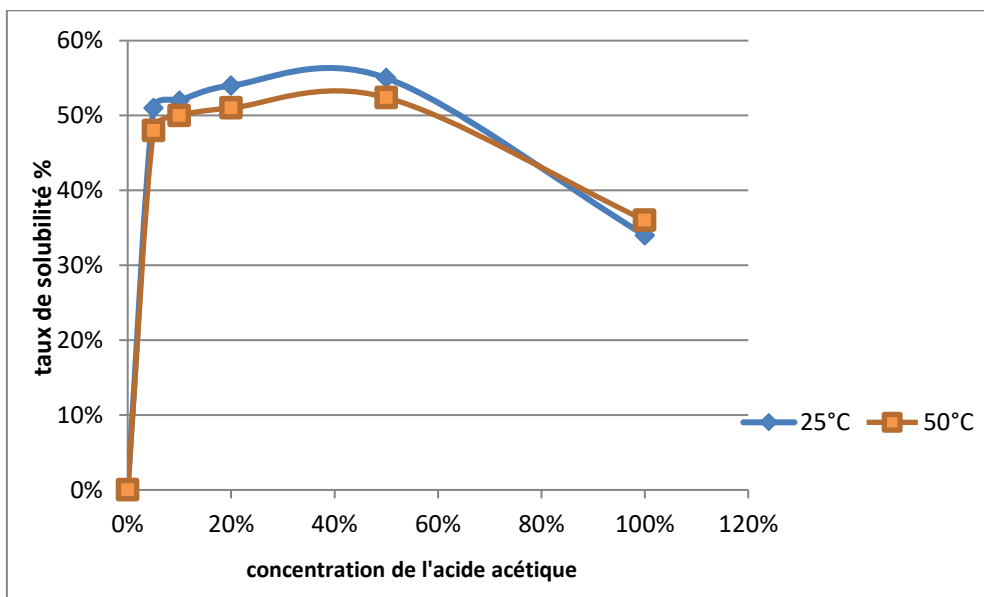


Figure 3 : taux de solubilité du chitosane de DDA=87.5 % en fonction de la concentration de l'acide acétique et de la température

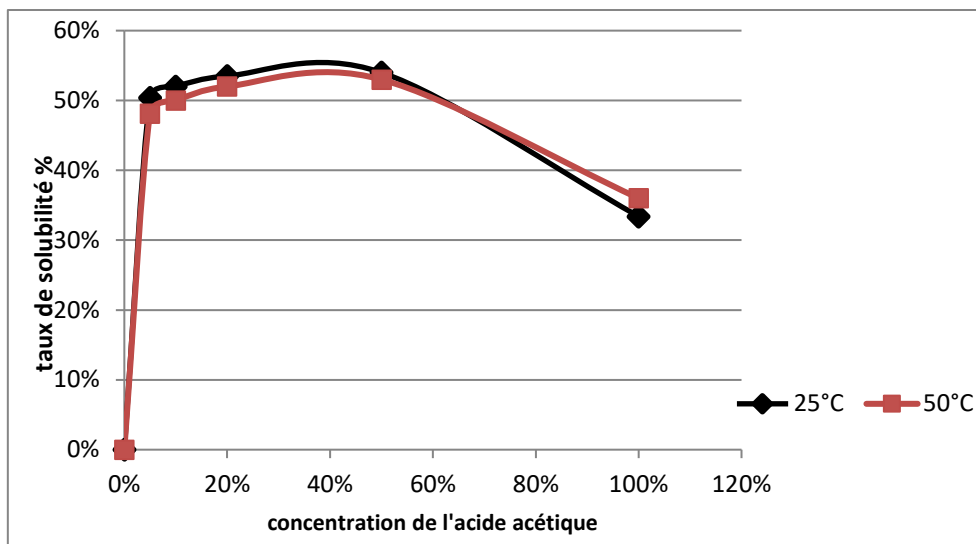


Figure 4 : taux de solubilité du chitosane de DDA=86.75 % en fonction de la concentration de l'acide acétique et de la température

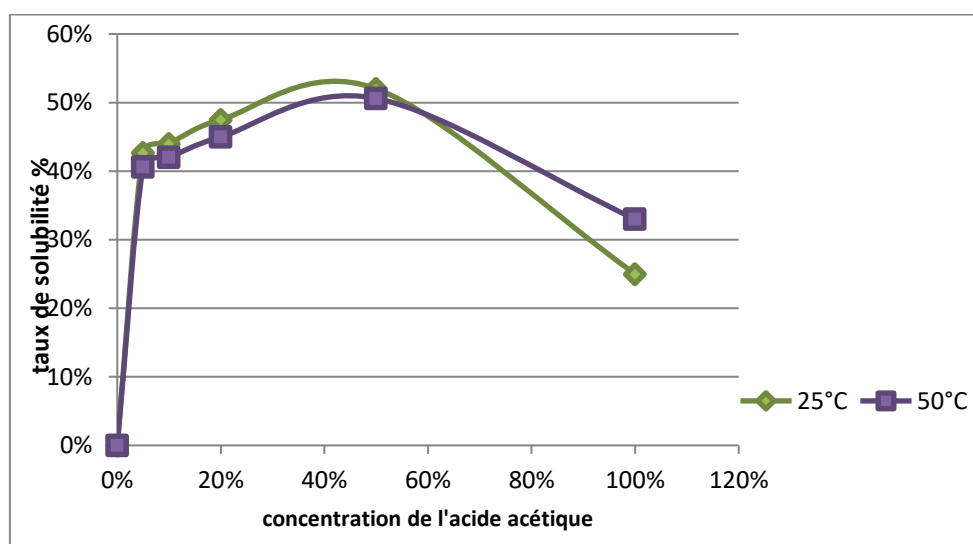


Figure 5 : taux de solubilité du chitosane de DDA = 85.69 % en fonction de la concentration de l'acide acétique et de la température

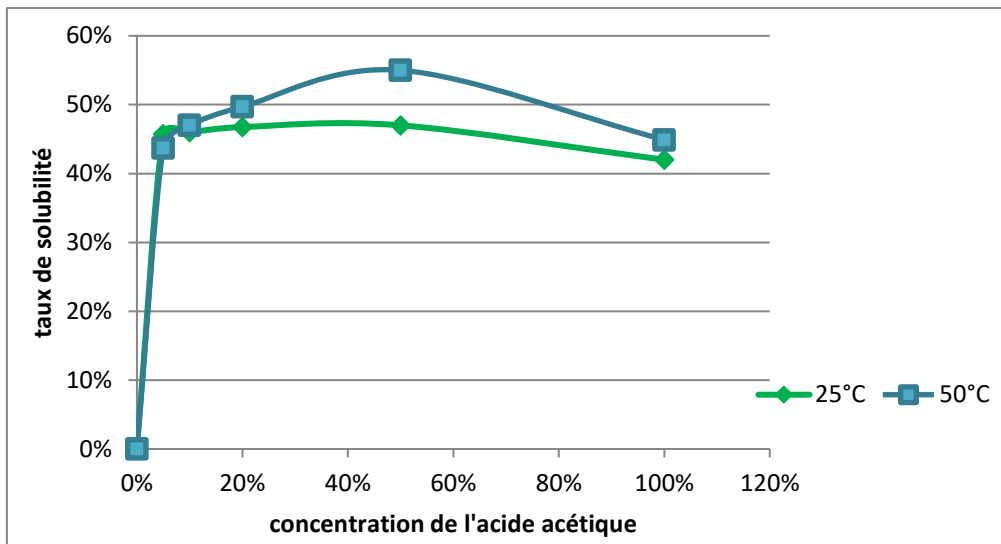


Figure 6 : taux de solubilité du chitosane de DDA= 85.66 % en fonction de la concentration de l'acide acétique et de la température

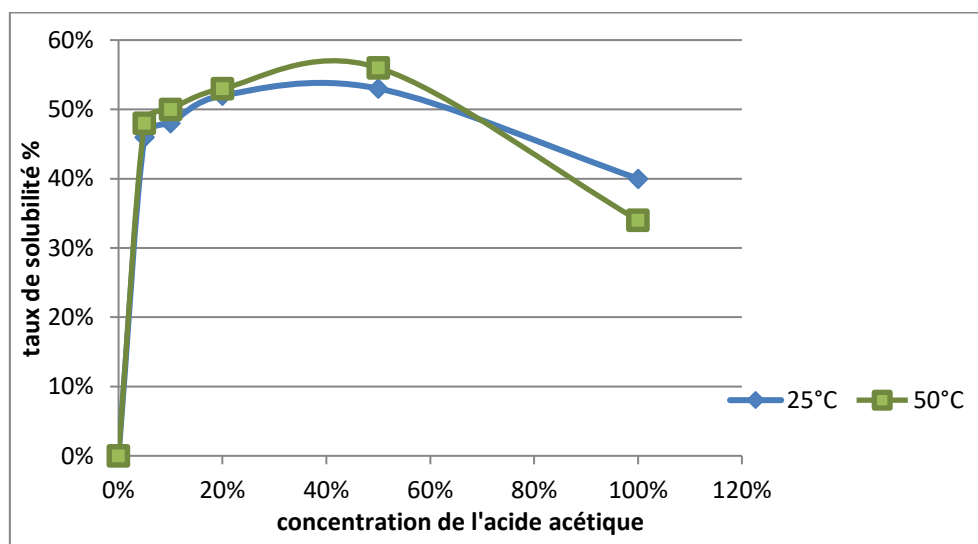


Figure 7 : taux de solubilité du chitosane de DDA=87.48 % en fonction de la concentration de l'acide acétique et de la température

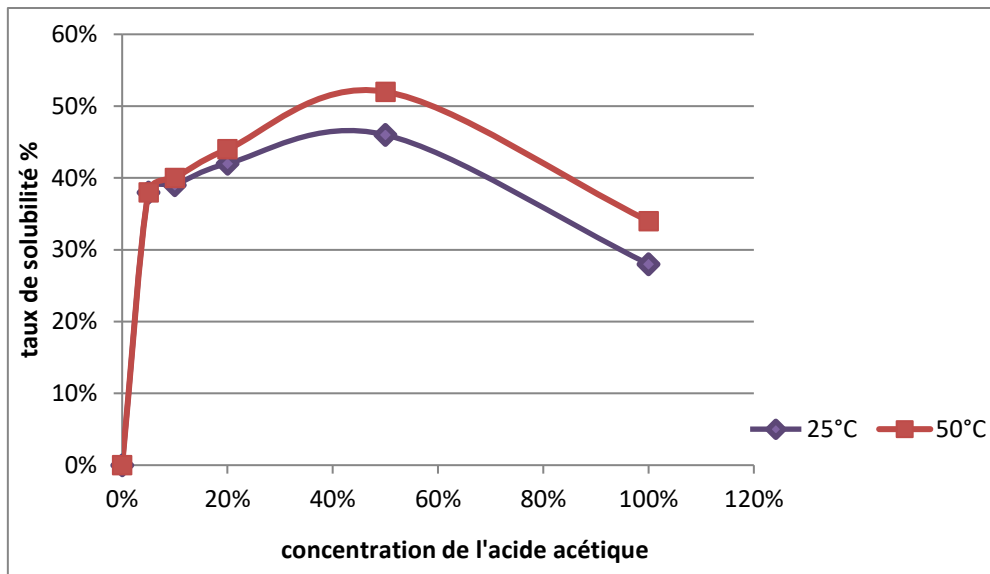


Figure 8 : taux de solubilité du chitosane de DDA=84.11 % en fonction de la concentration de l'acide acétique et de la température

Ces figures montrent que la solubilité des échantillons du chitosane atteint son maximum à une concentration de l'acide acétique de 50 %. Le chitosane atteint des taux de solubilité de 55 % à 69 %. En effet, le chitosane est soluble dans les acides faibles grâce à la protonation de ses groupes amine (-NH₂) libres suivant l'équilibre acido-basique :



ces protons proviennent de la dissociation de l'acide acétique suivant l'équilibre :



$$K_a = [\text{CH}_3\text{COO}^-] * [\text{H}_3\text{O}^+] / [\text{CH}_3\text{COOH}] \dots\dots\dots \text{Eq III.2}$$

Avec K_a : constante de dissociation de l'acide.

On remarque que plus la concentration de l'acide est importante plus sa constante de dissociation est faible. Par conséquent, il y aura moins de protons H⁺ libérés, ce qui engendre une diminution du taux de solubilité du chitosane. Comme il est montré dans les graphes quand la concentration de l'acide acétique est à 100%, c'est-à-dire le chitosane se retrouve dans l'acide acétique pure, le taux de solubilité est le plus faible. L'absence de l'eau provoque une partie du chitosane à s'agglomérer et précipiter. On se trouve devant un effet de saturation des entités cationiques et où l'excès précipite dans le milieu. Ce caractère partiel

de la solubilité nécessite une investigation plus approfondie pour élucider la nature des associations et des dissociations qui se sont révélées dépendantes de la concentration de l'acide.

L'effet de la température sur la solubilité du chitosane est aussi illustré sur les mêmes figures de 1 à 8. On y voit clairement que la température améliore la solubilité du chitosane. D'une manière générale la solubilité à 50 °C est plus élevée que celle à température ambiante (25°C). Nous n'avons pas essayé des températures plus élevées que 50 °C de crainte d'affecter la structure macromoléculaire du chitosane par une dégradation indésirable. A titre d'illustration, les échantillons du chitosane désacétylé à 10%-1h, à 30%-1h et à 40%-1h atteignent leur taux de solubilité maximal à 50°C. Cet effet thermique sur la solubilité était prévisible car la solubilité d'un composé dépend de la valeur du produit de solubilité K_s du composé et la valeur de K_s dépend de la température T selon la loi de Van t'Hoff :

$$\frac{d \ln(K_s)}{dT} = \frac{\Delta_{diss} H^\circ}{RT^2} \dots\dots\dots \text{Eq III.3}$$

Où $\Delta_{diss} H^\circ$ représente l'enthalpie standard de dissolution du composé que l'on considère généralement indépendante de la température (on prend le plus souvent sa valeur à 298 K).

La solubilité étant toujours une fonction croissante de K_s on comprend que le plus souvent la solubilité d'un composé augmente avec la température.

Comme il a été signalé dans le chapitre II, nous avons préparé 17 différents grades différents de chitosane mais nous avons estimé nécessaire de faire une sélection de 8 échantillons seulement pour étudier la solubilité.

2. Effet du pH de l'acide acétique sur la solubilité du chitosane

L'étude de l'effet du pH de l'acide acétique sur la solubilité du chitosane, a été réalisée sur des solutions de l'acide avec différents pH. La courbe ci-dessous représente le taux de solubilité en fonction du pH des solutions d'acide acétique.

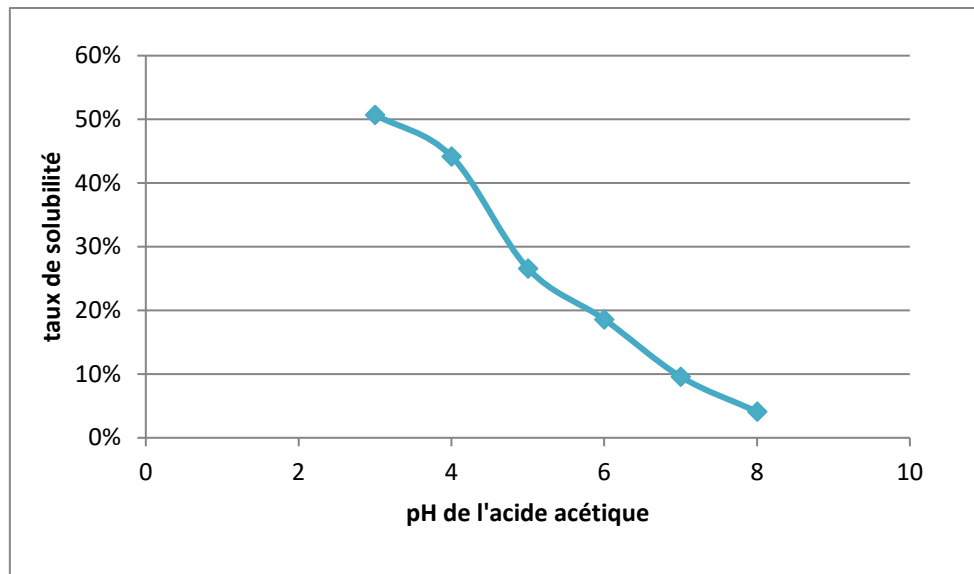


Figure 9 : taux de solubilité du chitosane son DDA= 86.8% en fonction du pH

On remarque que plus le pH augmente plus le taux de solubilité du chitosane diminue.

Le chitosane est insoluble dans les solvants organiques, ainsi que dans l'eau à pH neutre et basique en raison des nombreuses liaisons hydrogène entre les fonctions hydroxyle, amine, acétamide et éther. En revanche, il devient soluble en milieu acide grâce à la protonation de ses fonctions amine libres [5].

Les répulsions électrostatiques entre les charges portées par les amines protonées deviennent alors plus importantes que les interactions attractives intra et inter-chaînes (liaisons hydrogène) et permettent la solvation de la chaîne. La solubilité du chitosane est donc principalement gouvernée par l'hydratation des sites chargés.

Le chitosane est soluble quand le pH de l'acide est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6.3 [49].

En réalité, pour les polyélectrolytes, le pKa n'est pas constant, mais dépend du degré de dissociation α . Ainsi, en dessous du pKa du chitosane qui varie en fonction du DDA, une majorité de fonctions amine est protonée, et le polymère devient soluble. Le chitosane de configuration statistique où les amines sont protonés est considéré comme soluble dans un domaine de pH compris entre 1 et 6. Cette gamme n'est pas fixe et dépend fortement d'autres facteurs comme le DDA et la masse molaire. Cette situation est traduite sur la figure 10 où le chitosane que nous avons préparé est légèrement soluble à pH 7 ou pH 8.

3. Effet du degré de désacétylation du chitosane sur sa solubilité

La figure 11 montre l'influence du degré de désacétylation des échantillons du chitosane sur les taux de solubilité. La figure 11 met en évidence la différence en termes de solubilité de quatre échantillons ayant des degrés de désacétylation différents.

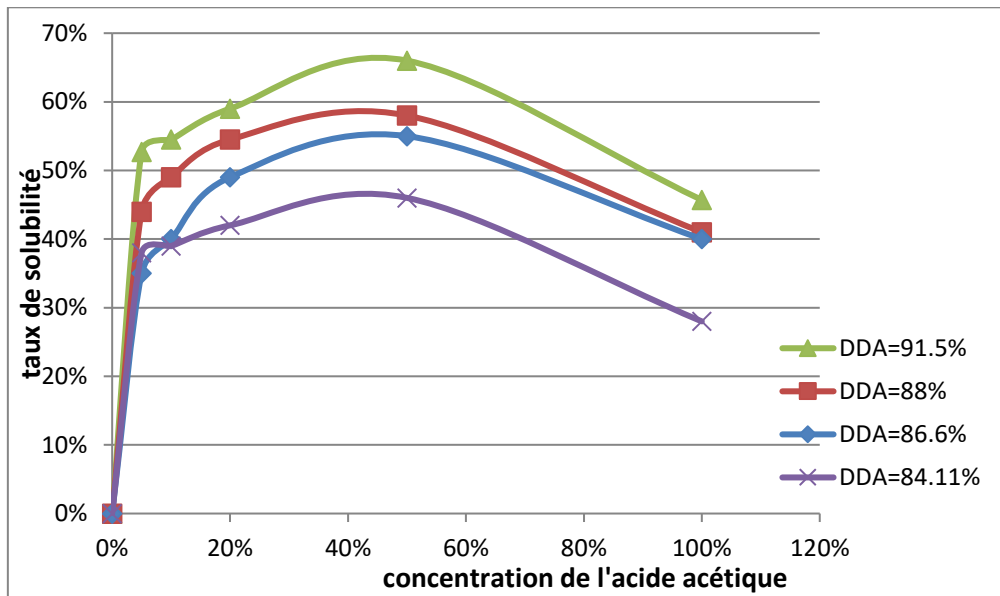


Figure 10 : taux de solubilité en fonction du degré de désacétylation du chitosane à différente concentration de l'acide acétique

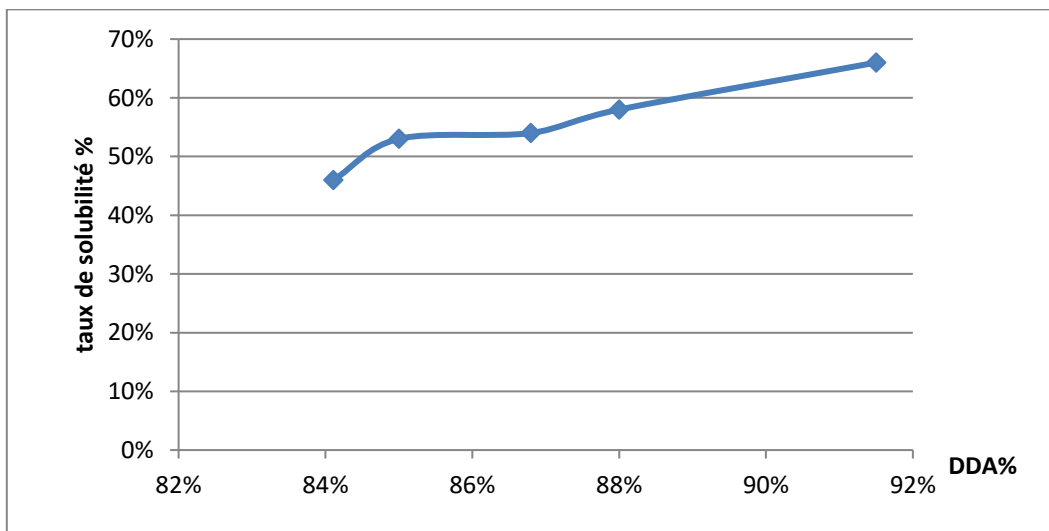


Figure 11 : taux de solubilité en fonction du degré de désacétylation du chitosane à 50% acide acétique

Comme prévu, on peut remarquer que plus le degré de désacétylation du chitosane augmente plus la solubilité du chitosane est importante. La solubilité en milieu acide du chitosane s'explique par le caractère cationique de ses fonctions amine lorsqu'elles sont protonées.

La densité de fonctions amine sur la chaîne polysaccharide, par conséquent le DDA, va donc beaucoup jouer sur la solubilité du chitosane.

L'augmentation de la proportion des motifs acétylés entraîne des gênes stériques qui seraient responsables d'une rigidification de la chaîne, ce qui entraîne l'insolubilité du chitosane [56].

Quand le degré de désacétylation du chitosane augmente, la proportion des groupes acétyle diminue et par conséquent la proportion des groupes amine augmente. Ceci facilite l'hydratation des sites chargés autrement dit la protonation des groupes amine $-NH_2$.

4. Effet de l'ajout du glycérol sur la solubilité du chitosane

Le but d'ajouter du glycérol vise à affaiblir les liaisons hydrogène dans le chitosane et ainsi aider à la solubilisation de la macromolécule. Donc le glycérol peut être considéré comme agent facilitateur de solubilisation. La figure 13 montre l'influence du taux de glycérol sur la solubilité du chitosane. Le glycérol a déjà été utilisé comme un plastifiant dans la préparation de films de chitosane pour ces propriétés qui diminuent les interactions intra et intermoléculaire entre les fonctions dans la chaîne polymérique. Autrement dit, les liaisons hydrogène et par conséquent les chaînes polymériques seront plus libre et plus mobiles, et donc l'hydratation des groupes ammonium sera plus importante [57].

Pour cette étude nous avons solubilisé une masse de chitosane dans des solutions d'acide acétique de 50% avec des proportions différentes de glycérol (1%, 2%, 5%, 10%, 15%).

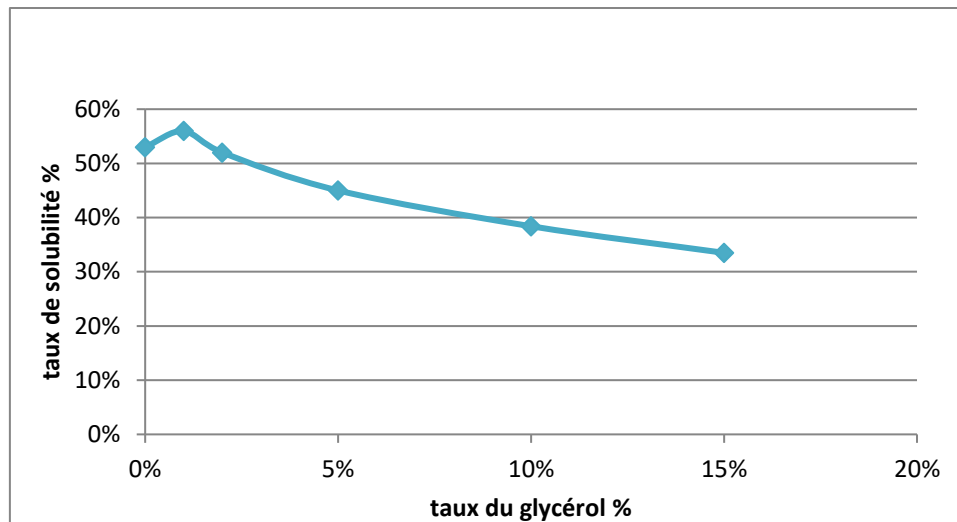


Figure 12 : taux de solubilité en fonction du taux de glycérol dans l'acide acétique

La figure montre l'évolution de la solubilité du chitosane en fonction du taux de glycérol, le premier point présente la solubilité de chitosane dans une solution de 50% d'acide acétique sans glycérol. On ajoutant 1% de glycérol la solubilité a fait un saut important et passe de 50 à 55 % comme maximum. En augmentant la quantité de glycérol on constate que le chitosane devient de plus en plus insoluble. L'effet du glycérol devient négatif rendant le chitosane moins soluble au-delà de 2 %.

Les calculs de la théorie fonctionnelle de la densité montrent que la molécule de glycérol est capable de former trois liaisons hydrogène avec l'unité glucosamine puisque la molécule de glycérol contient trois fonctions hydroxyles [58]. Celle-ci engendre un encombrement stérique limitant l'accès des molécules de l'acide acétique aux groupes ammonium se qui diminue leur solvation.

5. *Mesure de l'indice de réfraction*

Le but de cette caractérisation était de faire une corrélation entre l'indice de réfraction et la solubilité du chitosane. Nous avons mesuré l'indice de réfraction à l'aide d'un réfractomètre d'Abbe. Quelques gouttes de la solution de chitosane sont placées entre les deux prismes du réfractomètre ; le prisme réfractométrique et le prisme d'éclairage. La lecture de l'indice est ensuite faite à température ambiante.

Les résultats sont présentés dans les tableaux de (1 à 8)

Tableau 1 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA = 86.6%

25°C					
TS %	35	40	49	55	40
nd	1,3390	1,3415	1,3465	1,3595	1,3775
50°C					
TS %	47,70	49,70	55	61,40	44
nd	1,3370	1,3410	1,3460	1,3650	1,3740

Tableau 2 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA= 88%

25°C					
TS %	44	49	55	58	34
nd	1,337	1,3405	1,347	1,3645	1,374
50°C					
TS %	46	51	59	69	44,86
nd	1,3385	1,342	1,352	1,3685	1,3765

Tableau 3 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA = 87.5%

25°C					
TS %	54	52	49	55	34
nd	1,34	1,3435	1,35	1,371	1,3735
50°C					
TS %	48	50	51	52	36
nd	1,337	1,342	1,347	1,3635	1,374

Tableau 4 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité chitosane DDA= 86.7%

25°C					
TS%	50	52	54	55	34
nd	1,339	1,3415	1,3515	1,3685	1,3735
50°C					
TS %	48	50	52	53	36
nd	1,3365	1,3405	1,346	1,3635	1,3745

Tableau 5 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA% = 85.69%

25°C					
TS %	42,70	44,50	47,50	52,25	19,40
nd	1,3395	1,3405	1,3465	1,363	1,374
50°C					
TS %	41	43	45	50	33
nd	1,337	1,342	1,3505	1,362	1,375

Tableau 6 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA% = 84.66%

25°C					
TS %	45,73	46	46,75	47	42
nd	1,3395	1,3445	1,345	1,3635	1,378
50°C					
TS %	43,70	47	49,70	55	44,90
nd	1,339	1,343	1,3515	1,37	1,375

Tableau 7 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA% = 85.22%

25°C					
TS %	46	48	52	53	40
nd	1,342	1,341	1,3484	1,3634	1,377
50°C					
TS %	48	50	53	56	34
nd	1,3389	1,342	1,3467	1,3630	1,369

Tableau 8 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA% = 84.10%

25°C					
TS %	38	39	42	46	28
nd	1,337	1,34	1,3467	1,364	1,3734
50°C					
TS %	39	41	44	52	34
nd	1,3378	1,3401	1,3478	1,369	1,3723

A partir des résultats présentés dans les tableaux de 1 à 8 on remarque que plus le taux de solubilité augmente, l'indice de réfraction augmente.

Si on ignorait le dernier point du tableau où la solubilité diminue fortement mais l'indice de réfraction ne suit pas la même tendance, on peut se permettre de considérer sur les quatre premiers points du tableau que l'indice de réfraction évolue avec l'augmentation de la solubilité. Ces informations peuvent révéler que les chaînes polymériques ont des configurations en solution complexes et des configurations agrégées ne sont pas à exclure. Pour élucider ce phénomène des techniques d'investigation très poussées qui permettent de mesurer des tailles de particules nanométriques telle que la diffusion de lumière aux petits angles sont nécessaires

II. Conclusion

La cristallinité du chitosane est due aux nombreuses liaisons hydrogène entre les fonctions hydroxyle, amine, acétamide et éther [59]. La solubilité partielle du chitosane a une relation avec la cristallinité du polymère, plus le polymère est cristallin moins il est soluble.

Le chitosane est soluble dans les acides faibles grâce à la protonation de ses groupes amino (-NH₂) libres grâce aux protons issus de la dissociation de l'acide acétique.

Les résultats obtenus confirment que la solubilité du chitosane est influencée par plusieurs paramètres telles que la concentration, la température, le pH du solvant, le degré de désacétylation du chitosane et le taux du glycérol dans le solvant.

- Le chitosane atteint sa solubilité maximale dans les acides faible dilué
- La solubilité du chitosane dépend de la température T selon la loi de Van t'Hoff donc plus la température est élevée, plus la solubilité augmente
- La solubilité du chitosane dépend du pK_0 intrinsèque du chitosane qui n'est pas constant et évolue en fonction du degré désacétylation. Le chitosane est soluble dans un pH inférieur à son pK intrinsèque.
- La solubilité du chitosane est plus importante à des degrés de désacétylation élevé
- Le glycérol est bon plastifiant du chitosane puisque il augmente la flexibilité des films, mais sa présence dans le solvant au delà de 2 % diminue la solubilité du polymère.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif général de ce mémoire était de s'initier à la recherche autour d'un thème de recherche scientifique. L'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes et sa transformation en chitosane par désacétylation chimique était le thème choisi. Cette étude nous a permis de découvrir la réalité de la recherche scientifique et les défis rencontrés. Nous avons appris à utiliser différentes méthodes de caractérisation, essayer différentes expériences scientifiques et produire un éventail de grades de chitosane à partir d'une seule chitine de base.

L'objectif scientifique de ce mémoire était de valoriser des sous-produits d'origine marins (les carapaces de crevette) de la région mostaganemoise, en vue d'en extraire un matériau naturel non-toxique qui est le chitosane, de le caractériser et d'étudier sa solubilité dans différents milieux et sous différentes conditions.

Le chitosane était obtenue par une désacétylation chimique de la chitine par la soude caustique à différente concentration et à différente période de temps afin d'obtenir des degrés de désacétylation différents.

La chitine a été obtenue à partir des carapaces de crevette collectées à Mostaganem par trois traitements successifs : une déminéralisation, une déprotéinisation et enfin une décoloration.

La chitine et le chitosane ont été caractérisés par FTIR afin de déterminer les fonctions caractéristiques qu'ils contiennent et pH-métrie pour doser les amines protonnées et ainsi déterminer le degré de désacétylation des échantillons.

Les échantillons de chitosane obtenues ont des DDA% supérieure à 80% selon les conditions de la réaction de désacétylation (concentration de l'hydroxyde de sodium et le temps de réaction).

Et enfin nous avons étudié la solubilité du chitosane dans l'acide acétique/eau en fonction de plusieurs paramètres tel que la concentration, la température, le pH de l'acide acétique, le taux de glycérol dans le solvant et le degré de désacétylation du chitosane.

D'une manière générale les chitosanes que nous avons préparés étaient partiellement solubles à différents degrés quelles que soient les conditions utilisées. Ceci dépend de la structure cristalline des entités de la chitine restante sur la macromolécule qui elle-même dépend de l'origine de la matière naturelle. Il n'est pas exclu aussi d'avoir une proportion de chitine

réticulée. Le taux de solubilité du chitosane passe par un maximum en fonction de la concentration d'acide acétique dans le mélange acide acétique/eau puis diminue quand l'acide acétique est majoritaire. La température améliore la solubilité du chitosane.

La gamme de pH où le chitosane est soluble n'est pas fixe et dépend du pKa intrinsèque de la fonction amine du polymère qui dépend du degré de désacétylation et de la répartition des groupements amine le long de la chaîne polymérique.

La solubilité dépend aussi du DDA du chitosane. Plus le DDA est élevé plus les groupements amine sont nombreux et libre et leur protonation est plus facile.

Le glycérol ajouté au solvant en vue de rompre les liaisons hydrogène s'est révélé efficace qu'aux petites concentrations inférieure à 2 %. Ce qui laisse penser qu'il faut l'étudier en tant qu'agent solvatant et pas comme co-solvant.

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : LA CHITINE ET LE CHITOSANE

Figure 1 : la structure chimique de la chitine	03
Figure 2 : Représentation générale de la chitine comme copolymère de glucosamine et N-acétylglucosamine.....	03
Figure 3 : Les liaisons hydrogène en pointillés dans la structure de la chitine.....	04
Figure 4 : Schémas simplifiés des trois formes cristallines de la chitine.....	05
Figure 5 : Procédé d'extraction de la chitine et du chitosane.....	07
Figure 6 : la structure du chitosane.....	09
Figure 7 : structure chimique de la chitine et du chitosane	10
Figure 8 : (A) La désacétylation enzymatique, (B) la désacétylation chimique de la chitine.....	11
Figure 9 : La réaction de désacétylation de la chitine.....	12

CHAPITRE II : EXPLOITATION DES CRUSTACE (CREVETTES) EN VU DE LA PREPARATION ET LA CARACTERISATION DE LA CHITINE ET DU CHITOSANE

Figure 1: un échantillon de crevette rouge.....	16
Figure 2 : (A) carapace de crevette nettoyée ; (B) carapace de crevette séchée ; (C) la poudre des carapaces de crevette.....	17
Figure 3 : la déminéralisation de la poudre des carapaces.....	18
Figure 4 : la déprotéinisation de la poudre des carapaces.....	19
Figure 5 : l'aspect de la chitine pure après décoloration.....	20
Figure 6 : la formation du complexe biuret.....	20
Figure.7 : test de biuret négatif pour la chitine et positif pour les carapaces des crevettes.....	21
Figure 8 : différents échantillons de chitosane après désacétylation.....	22
Figure 9 : chitosane obtenu par désacétylation de la chitine à 90°C pendant 50 min.....	22

Figure 10 : spectre infrarouge de la chitine pure.....	28
Figure 11: spectre infrarouge du chitosane désacétylé à 10% NaOH dans différents périodes de temps.....	29
Figure 12: spectre infrarouge du chitosane désacétylé à 20% NaOH dans différents périodes de temps.....	29
Figure 13: spectre infrarouge du chitosane désacétylé à 30% NaOH durant différentes périodes de temps.....	30
Figure 14: spectre infrarouge du chitosane désacétylé à 40% NaOH durant différentes périodes de temps.....	30
Figure 15: spectre IR désacétylé à 50% NaOH pendant 50 mn à 90°C.....	31
Figure 16 : dosage pH-métrique du chitosane désacétylé à 10% NaOH.....	33
Figure 17 : dosage pH-métrique du chitosane désacétylé a 20% NaOH.....	33
Figure 18 : dosage pH-métrique du chitosane désacétylé à 30% NaOH.....	34
Figure 19 : dosage pH-métrique du chitosane désacétylé à 40% NaOH.....	34

CHAPITRE III : ETUDE DE SOLUBILITE DU CHITOSANE

Figure 1 : taux de solubilité du chitosane son DDA= 86.8% en fonction de la concentration de l'acide acétique et la température	41
Figure 2 : taux de solubilité du chitosane son DDA=88% en fonction de la concentration de l'acide acétique et la température	42
Figure 3 : taux de solubilité du chitosane son DDA=87.5% en fonction de la concentration de l'acide acétique et la température	42
Figure 4 : taux de solubilité du chitosane son DDA=86.75% en fonction de la concentration de l'acide acétique et la température	43
Figure 5 : taux de solubilité du chitosane son DDA=85.69% en fonction de la concentration de l'acide acétique et la température.....	43
Figure 6 : taux de solubilité du chitosane son DDA=85.66% en fonction de la concentration de l'acide acétique et la température	44

Figure 7 : taux de solubilité du chitosane son DDA=87.48% en fonction de la concentration de l'acide acétique et la température	44
Figure 8 : taux de solubilité du chitosane son DDA=84.11% en fonction de la concentration de l'acide acétique et la température	45
Figure 9 : taux de solubilité du chitosane son DDA= 86.8% en fonction du pH.....	47
Figure 10 : taux de solubilité en fonction du degré de désacétylation du chitosane à différente concentration de l'acide acétique	48
Figure 11 : taux de solubilité en fonction du degré de désacétylation du chitosane à 50% acide acétique	48
Figure 12 : taux de solubilité en fonction du taux de glycérol dans l'acide acétique.....	50

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I : LA CHITINE ET LE CHITOSANE

Tableau 1 : Sources potentielles de la chitine.....	06
Tableau 2 : principales applications du chitosane.....	13

CHAPITRE II : EXPLOITATION DES CRUSTACE (CREVETTES) EN VU DE LA PREPARATION ET LA CARACTERISATION DE LA CHITINE ET DU CHITOSANE

Tableau 1: Produits chimiques utilisés dans l'extraction de la chitine.....	17
Tableau 2: Rendements des différentes étapes d'extraction de la chitine.....	23
Tableau 3: Rendement de la chitine désacétylée à 10% NaOH.....	24
Tableau 4: Rendement de la chitine désacétylée à 20% NaOH.....	24
Tableau 5 : Rendement de la chitine désacétylée à 30% NaOH.....	24
Tableau 6: Rendement de la chitine désacétylée par 40% NaOH.....	24
Tableau 7 : Rendement de la chitine désacétylée par 50% NaOH à 90°C pendant 50 mn....	25
Tableau 8 : les bandes caractéristiques de la chitine.....	28
Tableau 9 : les bandes caractéristiques du chitosane.....	31
Tableau 10 : DDA% du chitosane désacétylé à 10% NaOH.....	34
Tableau 11 : DDA% du chitosane désacétylé à 20% NaOH.....	35
Tableau 12 : DDA% du chitosane désacétylé à 30% NaOH.....	35
Tableau 13 : DDA% du chitosane désacétylé à 40% NaOH.....	35
Tableau 14 : DDA% du chitosane désacétylé à 50% NaOH.....	35

CHAPITRE III : ETUDE DE SOLUBILITE DU CHITOSANE

Tableau 1 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA = 86.6%.....	51
Tableau 2 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA= 88%.....	51
Tableau 3 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA = 87.5%.....	51
Tableau 4 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité chitosane DDA= 86.7%.....	52
Tableau 5 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA% = 85.69%.....	52
Tableau 6 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA% = 84.66%.....	52
Tableau 7 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA% = 85.22%.....	53
Tableau 8 : indice de réfraction en fonction du taux de solubilité du chitosane DDA% = 84.10%.....	53

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] FAO, 2008. SOFIA - The state of world fisheries and aquaculture, In. Rome: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*: 196
- [2] Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632, (2006).
- [3] Kasaai MR: Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *J Agric Food Chem*, , 57(5), 1667-1676, (2009).
- [4] Ravi Kumar, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27, (2000).
- [5] Kubota N, Eguchi Y. Facile preparation of water-soluble N-acetylated chitosan and molecular weight dependence of its water-solubility. *Polym J* **29**, 123–127, (1997)
- [6] Aiba S. Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. *Int J Biol Macromol* ;13, 40–4, (1991).
- [7] Rinaudo M, Domard A. Solution properties of chitosan. In: Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sandford P, editors. Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. *London and New York: Elsevier*; 1989.
- [8] Wu T, Zivanovic S: Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *Carbohydr Polym* ,73(2),248-253,(2008)
- [9] Kadokawa J-i, Takegawa A, Mine S, Prasad K: Preparation of chitin nanowhiskers using an ionic liquid and their composite materials with poly(vinyl alcohol). *Carbohydr Polym*, 84(4), 1408-1412, (2011)
- [10] Kasaai MR: Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydr Polym*, 68(3), 477-488, (2007).

- [11] Haripriya S, Kanayairam V, Ramanibai R. Chitin And Chitosan Preparation From Shrimp Shells *Penaeus Monodon* And Its Human Ovarian Cancer Cell Line PA-1, *International Journal Of Biological Macromolecules*, 107, 662-667, (2018).
- [12] Analysis of Chitin and Chitosan IN "Chitin chemistry". Roberts, G. A. F. *MacMillan Press Ltd. London*. (1992): 94-95.
- [13] "Chitin in nature and technology" eds. Muzzarelli, R. A., Jeuniaux, C., and Gooday, G. W. *Plenum Press. New York* 385 (1986).
- [14] Rouget, Ch. "Des substances amyliques dans les tissus des animaux, spécialement des Articulés (chitine)." *Comp. Rend* 48, 792-795, (1859).
- [15] "From chitin to chitosan." IN Chitosan-Based Hydrogels Functions and Applications eds. Kangde Yao, Junjie Li, Fanglian Yao, Yuji Yin. Teng, D, *CRC Press—Taylor and Francis Group* 1-37, (2012).
- [16] "Chitin and chitosan" IN Food Polysaccharides and Their Applications. Winterowd, J. G., and P. A. Sandford. 441-441, (1995).
- [17] chitosan (preparation, structure, and Properties) IN Concise Polymeric Materials Encyclopedia edi-in-chief. Attila E. Pavlath, Dominic W.S. Wong and George H. Robertson, (2009)
- [18] Felt O. Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique, Thèse de Doctorat, Université de Genève, 1999.
- [19] Chitin, *Pergamon IN Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application*, Press, Oxford, chap 2 Muzzarelli, A. Riccardo, (1977).
- [20] Peesan, M., Rujiravanit, R., and Supaphol, P. "Characterisation of beta-chitin/poly (vinyl alcohol) blend films." *Polymer testing* 22(4), 381-387, (2003).
- [21] Rudall, K. M., and W. Kenchington. "The chitin system." *Biological Reviews* 48(4), 597-633, (1973).

[22] Austin, P.R. "Chitin solvents and solubility parameters." *Chitin, Chitosan, and Related Enzymes. Academic press* (1984). 227-237.

[23] From blends and composites to gels and complex networks, Thomas, S., et al., eds. *Handbook of biopolymer-based materials*, John Wiley and Sons, 2013.

[24] Sannan, T., Kurita, K., and Iwakura, Y. "Studies on chitin, 2. Effect of désacétylation on solubility." *Macromolecular Chemistry and Physics* 177(12), 3589-3600, (1976).

[25] Atkins, E. "Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates." *Journal of Biosciences* 40(8), 375-387, (1985).

[26] Rudall, K.M. "Chitin and its association with other molecules." *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*, 28(1), (1969).

[27] Kenchington, W. "Adaptation of insect peritrophic membranes to form cocoon fabrics." *The Insect Integument*, 11, 497-513, (1976).

[28] Shahidi, F. and Abuzaytoun, R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res.*, 49, 93-135, (2005).

[29] Chitine et chitosane ;Préparation, propriétés et principales applications ; In Chitine et chitosane du biopolymère à l'application. Crini G, Guibal E, Morcellet M, Torri G, Badot P. *Besançon: Presses universitaires de Franche-Comté* ; (pp. 19-54) 2009.

[30] Rao MS, Nyein KA, Trung TS, Stevens WF: Optimum parameters for production of chitin and chitosan from squilla (*S. empusa*). *J Appl Polym Sci*, 103(6), 3694-3700, (2003).

[31] Tolaimate A, Desbrieres J, Rhazi M, Alagui A: Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer*, 44(26), 7939-7952, (2003).

- [32] Al Sagheer FA, Al-Sughayer MA, Muslim S, Elsabee MZ: Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydr Polym*, 77(2), 410-419, (2009).
- [33] Lavall RL, Assis OBG, Campana SP: beta-Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization. *Bioresour Technol*, 2007, 98(13), 2465-2472
- [34] Osorio-Madrado A, David L, Trombotto S, Lucas JM, Peniche-Covas C, Domard A: Kinetics Study of the Solid-State Acid Hydrolysis of Chitosan: Evolution of the Crystallinity and Macromolecular Structure. *Biomacromolecules*, 11(5), 1376-1386, (2010).
- [35] De Holanda HD, Netto FM: Recovery of Components from Shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) Processing Waste by Enzymatic Hydrolysis. *J Food Sci*, 71(5), C298-C303, (2006)
- [36] Yang, B.Y. & Montgomery, R. Degree of acetylation of heteropolysaccharides., *Carbohydr. Res* (323), 156-162, (2000).
- [37] Seng, J.M. Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur*, 9, 40-44, (1988).
- [38] Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y.-J. *Food applications of chitin and chitosans. Trends in Food Science & Technology*, 10(2), 37–5, (1999).
- [39] No H.K, Meyers S.P., and Lee K.S. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *J. of Agric. and Food chem.* (37), 575-579, (1989).
- [40] Hirano, S., & Nagano, N. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens., *Agricultural and Biological Chemistry* (53), 3065–3066, (1989).
- [41] Frehaut, G. Un procédé “propre” de production du chitosane. *Bulletin Électronique (BE) Allemagne*, pp 121, (2002).
- [42] Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Arg UY elles-Moral, W., Desbrières, J. & Rianudo, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymeres* (42), 3569-3580, (2001).

- [43] Kasaai, M. R., Arul, J., Chin, S.L. & Charlet, G. The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 786- 205, (1999).
- [44] Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Versali, M.F. & Rinaudo, M. Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan., *Biomacromol* 1(4), 746-751, (2000).
- [45] Maghami, G. G., & Roberts, G. A. F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Die Makromolekulare Chemie*, 189 (1), 195-200, (1988).
- [46] Chen, W., Adams, R.L., Carubelli, R. & Nordquist, R.E. Laser- Photosensitizer assisted immunotherapy : Anovel modality for cancer treatment., *Cancer Lett.* 115(1), 25-30, (1997).
- [47] Elias A, « Étude du processus de coagulation-floculation du système montmorillonite-chitosane dans l'élimination de métaux de transition », Université du QUÉBEC À MONTRÉAL, p. 8-13, (2006).
- [48] Cho, y. W. ; J. Jang, *et al.* «Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. » *Biomacromolecules* 1 (4), 609-614, (2000).
- [49]<http://sites.ensfea.fr/physique-chimie/wp-content/uploads/sites/10/2016/10/2-test-du-biuret.pdf>
- [50] Khan, A. G.; Azim, A.; Nadeem, M. A.; Ayaz, M. The effect of formaldehyde treatment of solvent and mechanical extracted cottonseed meal on the performance, digestibility and nitrogen balance in lambs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 13 (6), 785-790, (2000).
- [51] Tolaimate A., J. Desbrières, M. Rhazi, A. Alagui, M. Vincendon et P. Vottero. «On The Influence of Deacetylation Process on The Physicochemical Characteristics of Chitosan from Squid Chitin». *Polymer.* 41, 2463-2469, (1999).
- [52] Yi, H., Wu, L.-Q., Bentley, W. E., Ghodssi, R., Rubloff, G. W., Culver, J. N., et al. Biofabrication with Chitosan. *Biomacromolecules*, 6(6), 2881-2894, (2005).
- [53] P. Sorlier, A. Denuziere, C. Viton, A. Domard, Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan, *Biomacromolecules.* 2, 765–772, (2001).

- [54] Y.W.N. Cho, S.H. Chung, G. Yoo, S.W. Ko, Water-soluble Chitin as a Wound Healing Accelerator, *Biomaterials*. 20, 2139–2145, (1999).
- [55] Mohy Eldin M.S, Soliman E.A, Hashem A.I and Tamer T.M. Antibacterial Activity of Chitosan Chemically Modified with New Technique. *Trends Biomater. Artif. Organs*. 22(3), 121-133, (2008).
- [56] P. Sorlier, Etude physico-chimique de solution de chitosane et relations avec ses propriétés antigéniques, *Université Claude Bernard Lyon 1*, (2002).
- [57] Tsai, C.-C., Morrow, B. H., Chen, W., Payne, G. F., & Shen, J. Toward understanding the environmental control of hydrogel film properties: How salt modulates the flexibility of chitosan chains. *Macromolecules*, 50(15), 5946-5952, (2017).
- [58] Domján, A., Bajdik, J., & Pintye-Hódi, K. Understanding of the plasticizing effects of glycerol and PEG 400 on chitosan films using solid-state NMR spectroscopy. *Macromolecules*, 42(13), 4667-4673, (2009).
- [59] Ogawa, K., Yui, T., & Okuyama, K. Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1), 1-8, (2004).