

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DÉVELOPPEMENT DE PROCÉDÉS DE PRODUCTION D'UN ANTIGERMINATIF ET D'UN
ANTIMICROBIEN POUR LE TRAITEMENT DE LA POMME DE TERRE POST-RÉCOLTE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR

MATHIEU DESROSIERS

OCTOBRE 2025

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

PRÉSENTATION DU JURY D'ÉVALUATION

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

CHIMIE (MAÎTRISE)

Direction de recherche :

Simon Barnabé

Prénom et nom

directeur de recherche

Benoit Daoust

Prénom et nom

codirecteur de recherche

Jury d'évaluation

Simon Barnabé

Prénom et nom

directeur de recherche

Benoit Daoust

Prénom et nom

codirecteur de recherche

Mathieu Frenette

Prénom et nom

Évaluateur Interne

Fonction du membre de jury

Shawn Collins

Prénom et nom

Évaluateur Externe

Fonction du membre de jury

REMERCIEMENTS

- Simon Barnabé, professeur au département de biochimie, chimie, physique et science forensique à l'Université du Québec à Trois-Rivières pour sa confiance en mes capacités, son support et sa grande aide afin de développer mon réseau de contacts.
- Benoit Daoust, professeur au département de biochimie, chimie, physique et science forensique à l'Université du Québec à Trois-Rivières pour son suivi formateur, son intérêt envers le projet et sa confiance en mon esprit scientifique.
- Shawn Collins, professeur titulaire au département de chimie de la Faculté des arts et des sciences de l'Université de Montréal pour la correction du mémoire et son expertise notamment quant à la chimie en flux continu.
- Mathieu Frenette, professeur au département de chimie de l'Université du Québec à Montréal pour la correction du mémoire présenté et ses conseils constructifs en chimie organique et en spectroscopie.
- David Gagnon, chimiste R&D chez Kemitek à Thetford Mines pour ses encouragements, sa supervision et ses défis scientifiques visant à développer mes capacités de raisonnement.
- Kemitek et ses employés pour leur support dans mon retour aux études après 12 ans d'emploi chez eux. Tout particulièrement : Edwin Rodriguez, David Gendron, Alain Tremblay, Jean-Yves Bergeron, Étienne Dubuc et Hamza El Kaa.
- Innofibre et les chercheuses Nathalie Bourdeau et Mélanie Trudel pour leur gestion des nombreux projets, leurs suivis efficaces, leur direction et leur support dans mes travaux.
- Michelle Boivin, chargée de projet en recherche et innovation chez Agrinova pour son support, ses heures de consultation bénévoles et sa bonne humeur contagieuse.

- Agrinova, Transbiotech et ses employés dont Sophie Massie et Sarah Paris-Robidas pour leur implication dans les projets de recherche, leurs essais en entrepôt des traitements développés et les tests complémentaires nécessaires à la commercialisation des produits développés.
- Sabrina Grenier, étudiante à la Maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire à l'UQTR pour son aide quant à la microbiologie, son franc parlé et sa collaboration au cours du projet.
- Alice Claveau, Francis Boudreau, Samuel Huppé, stagiaires chez Kemitek pour leur aide sur de multiples aspects dont la chromatographie gazeuse sur colonne chirale, les extractions en laboratoire et les suivis de réaction.
- Les intervenantes et intervenants de l'IZÉ3, Trois-Rivières, pour leur support lors de mes visites, dont Daniel Bégin, France Lemay et particulièrement Kézia Milette lors des multiples analyses de microscopie à balayage et à transmission.
- Les différents organismes participant aux projets dont le CRPTQ, Mitacs, le CLD Domaine du Roy et les partenaires industriels McCain Foods et Sani-Marc pour leurs contributions aux projets et les bourses allouées sans lesquelles je n'aurais pu me permettre d'embarquer dans cette aventure.

DÉDICACE

Je dédicace ce travail à Zoé Desrosiers. Depuis 2013, elle a été à mes côtés dans les moments les plus faciles et les plus durs. Au travers des soirées bordées de solitude, elle a su me tenir compagnie à sa façon. Toujours partante pour me suivre dans des aventures en nature ou même au travail où elle était appréciée, elle ne se plaignait jamais beaucoup.

Depuis sa jeunesse malcommode, elle avait une personnalité remplie de bienveillance et d'affection. Elle adorait l'attention des autres et n'a jamais été malveillante dans ses agissements. Depuis le début de mes études, elle devait composer avec certaines absences prolongées dues à mes obligations, mais elle ne m'en tenait pas regard. Elle me supportait tout de même lorsque j'étais présent avec des interventions ponctuelles. Malheureusement, elle m'a quitté en octobre 2024 et ce fut une étape extrêmement difficile à surmonter. Il ne se passe pas une journée sans que je pense à toi, Zoé. Ta présence égayait mes journées et remplissait la maison d'une présence inoubliable. Merci d'avoir été avec moi et de m'avoir suivi même là où tu ne pouvais pas toujours. Merci de l'affection que tu me portais, qui signifiait beaucoup plus que tu ne pourrais l'imaginer. Tu as été là pour me tenir compagnie dans les moments de solitude, même si j'étais physiquement entouré. Certaines personnes ne peuvent pas comprendre le concept, mais sache que tu as marqué ma vie plus que la majorité des gens qui l'ont croisée. Merci pour tout, Zoé.

Merci, mon chien.

AVANT-PROPOS

Ce projet de maîtrise est rendu possible grâce aux montants dédiés aux étudiants gradués obtenus lors de la demande de subvention « ***Développement et mise à l'échelle d'extractibles forestiers***, CARD 2 565748-21 numéro » au CRIBIQ et fournis par MITACS. Les centres Kemitek, Innofibre, Agrinova, Transbiotech et l'UQTR ont déposé conjointement plusieurs demandes de financement afin d'atteindre les multiples objectifs envisagés. Un taux de succès élevé a résulté en des fonds suffisants pour l'inclusion de deux étudiants gradués. Les centres de recherche constituent l'équipe de projet à laquelle le présent travail fera référence.

Cet aspect du projet s'inscrit en complément des travaux principaux réalisés par les centres formant l'équipe de projet. Il découle des recherches des employés et stagiaires d'Innofibre et de l'UQTR (Simon Barnabé et Michelle Boivin étudiante à la maîtrise) qui ont découvert des propriétés antigerminatives et antimicrobiennes dans la biomasse forestière disponible au Québec.

Ce projet est pour moi un retour aux études après près de quinze ans sur le marché du travail. Ayant atteint le sommet de mon poste chez Kemitek, c'est dans le but de progresser professionnellement que j'ai entrepris cette aventure. Après avoir pris connaissance d'une opportunité disponible pour un étudiant à la maîtrise dans le projet « Extraits pommes de terre » chez Kemitek, j'ai posé ma candidature auprès du professeur Simon Barnabé de l'Université du Québec à Trois-Rivières. À l'issue du processus de sélection, ma candidature a été retenue. Afin de pouvoir m'octroyer un diplôme de maîtrise en chimie, il a fait appel à son collègue Benoit Daoust, lui aussi professeur à l'UQTR, de ce fait le nommant co-directeur de mon cheminement.

À l'heure du dépôt, ce mémoire ne peut être rendu public puisque des demandes de brevet sont ou seront en cours par les partenaires industriels. Quiconque consulte ce document se doit de respecter cette confidentialité jusqu'à ce qu'elle soit officiellement levée. Par ailleurs, ceux et celles ayant accès au présent document ont préalablement été informés de l'aspect confidentiel. Ils acceptent les conditions reliées à cette consultation.

TABLE DES MATIÈRES

PRÉSENTATION DU JURY D'ÉVALUATION.....	ii
REMERCIEMENTS	iii
DÉDICACE	v
AVANT-PROPOS.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX	xvi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xviii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xix
RÉSUMÉ.....	xxi
ABSTRACT	xxii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 Travail préparatoire.....	8
1.1 Caractérisation des molécules à l'étude	8
1.1.1 Approvisionnement et propriétés physico-chimiques	11
1.1.2 Spectres infrarouges	14
1.1.3 Spectres de résonance magnétique nucléaire.....	16
1.1.4 Chromatographie chirale en phase gazeuse.....	24
1.2 Composition de la térébenthine et de l'huile essentielle d'épinette noire	44
1.2.1 Composition de l'huile essentielle d'épinette noire	44
1.2.2 Composition de la térébenthine d'épinette noire.....	50
1.2.3 Analyse des lots d'acétate d'isobornyle (4) et de la térébenthine commerciale	53
1.3 Prétraitement de la térébenthine non raffinée	55
1.3.1 Désodorisation de la térébenthine brute à l'échelle laboratoire	57
1.3.2 Désodorisation de la térébenthine brute à l'échelle pilote.....	58
CHAPITRE 2 Synthèse de l'agent antigerminatif	60
2.1 Isomérisation du α -pinène (1) et β -pinène (2).....	60
2.1.1 Synthèse des nanotubes d'oxyde de titane (IV)	64
2.1.2 Catalyseurs alternatifs	78
2.1.3 Isomérisation en lot	80
2.1.4 Isomérisation en flux continu	85
2.1.5 Purification du camphène (3) synthétisé.....	96

2.2	Estérification du camphène (3).....	99
2.2.1	Estérification en lot.....	100
2.2.2	Estérification en flux continu.....	107
2.2.3	Purification de l'acétate d'isobornyle (4) obtenue.....	119
2.3	Détermination du chemin synthétique.....	126
2.3.1	Isomérisation.....	126
2.3.2	Estérification.....	134
2.4	Preuve de concept.....	139
2.4.1	α -pinène (1).....	139
2.4.2	Térébenthine.....	144
2.5	Évaluation des coûts de production.....	147
2.5.1	Recherche des prix industriels.....	147
2.5.2	Calcul du coût de production de l'acétate d'isobornyle (4).....	149
2.5.3	Comparaison aux traitements existants.....	154
CHAPITRE 3 Traitement antimicrobien : Identification, extraction et évaluation.....		157
3.1	Identification de l'agent antimicrobien par séparation bioguidée.....	157
3.1.1	Séparation bioguidée.....	158
3.1.2	Détermination des familles de molécules dans les fractions.....	163
3.1.3	Formulation.....	166
3.1.4	Analyses antimicrobiennes des fractions séparées.....	166
3.2	Optimisation de l'extraction.....	171
3.2.1	Extractions au solvant.....	172
3.2.2	Détermination des familles de molécules extraites.....	177
3.2.3	Analyses antimicrobiennes par fluorescence.....	180
3.2.4	Filtration.....	181
3.3	Étude technico-économique.....	185
3.3.1	Aspects technico-économiques à l'étude.....	186
3.3.2	Données énergétiques.....	187
3.3.3	Procédé au solvant.....	189
3.3.4	Exemple de calcul.....	191
3.3.5	Évaluation des coûts du procédé au solvant.....	192
3.3.6	Évaluation des coûts du procédé original à l'eau.....	196
3.3.7	Comparaison des échelles.....	201
CONCLUSION.....		202
ANNEXE A Méthode expérimentale.....		208
ANNEXE B Spectres FTIR.....		219
ANNEXE C Spectres RMN.....		221
ANNEXE D Chromatogrammes GC-FID.....		228

ANNEXE E Rapports des séparations par Biotage236

ANNEXE F Protocole de quantification sur microplaque des logs de réduction du nombre de colonies bactériennes.....240

ANNEXE G Facture d'électricité de Kemitek.....248

RÉFÉRENCES249

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structure chimique des énantiomères du α -pinène (1).....	9
Figure 1.2 Structure chimique des énantiomères du β -pinène (2).....	9
Figure 1.3 Structure chimique des énantiomères du camphène (3).....	9
Figure 1.4 Structure chimique des énantiomères de l'acétate d'isobornyle (4).....	10
Figure 1.5 Structure chimique des énantiomères de l'acétate de bornyle (5)	10
Figure 1.6 Spectre FTIR du α -pinène (1) racémique.....	14
Figure 1.7 Spectre FTIR du (-)- β -pinène (2)	15
Figure 1.8 Spectre RMN ^1H du α -pinène (1) racémique.....	16
Figure 1.9 Spectre RMN ^1H du (-)- β -pinène (2)	17
Figure 1.10 Spectre RMN ^1H du camphène (3) racémique	18
Figure 1.11 Spectre RMN ^1H de l'acétate d'isobornyle (4) racémique.....	19
Figure 1.12 Spectre RMN ^1H du (-)-acétate de bornyle (5)	20
Figure 1.13 Superposition des agrandissements des spectres ^1H des molécules étudiées	21
Figure 1.14 Superposition de la région de 0 à 3 ppm des spectres RMN ^1H des molécules étudiées.....	23
Figure 1.15 Programme de température du four du chromatographe	25
Figure 1.16 Chromatogramme du (+)- α -pinène (1) énantiomèrement enrichi	26
Figure 1.17 Chromatogramme du (-)- α -pinène (1) énantiomèrement enrichi.....	27
Figure 1.18 Chromatogramme du α -pinène (1) racémique	28
Figure 1.19 Chromatogramme du (-)- β -pinène (2)	29
Figure 1.20 Chromatogramme du camphène (3) racémique.....	30
Figure 1.21 Chromatogramme du (+)-camphène (3)	31
Figure 1.22 Mécanisme de l'hydrolyse de l'acétate d'isobornyle (4) en milieu basique	32
Figure 1.23 Superposition des spectres RMN ^1H de l'isobornéol (6) commercial (rouge) et du produit d'hydrolyse (bleu).....	33

Figure 1.24 Chromatogramme du produit d'hydrolyse de l'acétate d'isobornyle (4) racémique	34
Figure 1.25 Superposition des spectres RMN ¹ H : Hydrolyse de l'acétate de bornyle (5) (bleu) et bornéol (7) (rouge)	35
Figure 1.26 Chromatogramme du produit d'hydrolyse du (-)-acétate de bornyle (5).....	36
Figure 1.27 Superposition des spectres RMN ¹ H de l'acétate de bornyle (5) (bleu) et des produits d'estérifications du (+)-bornéol (7) en vert et (-)-bornéol (7) en rouge.....	37
Figure 1.28 Chromatogramme du produit d'estérification du (-)-bornéol (7).....	38
Figure 1.29 Chromatogramme du produit d'estérification du (+)-bornéol (7).....	39
Figure 1.30 Chemin synthétique des transitions entre l'acétate de bornyle (5) et le bornéol (7)	41
Figure 1.31 Agrandissement de la région caractéristique des spectres RMN ¹ H des molécules étudiées dans l'huile essentielle d'épinette noire	45
Figure 1.32 Agrandissement de la superposition des spectres RMN ¹ H entre 4,40 et 4,80 ppm de l'huile essentielle et des molécules connues	46
Figure 1.33 Chromatogramme GC-FID chiral de l'huile essentielle d'épinette noire Boréa.....	47
Figure 1.34 Agrandissement de la région caractéristique des spectres RMN ¹ H des molécules étudiées dans la térébenthine	50
Figure 1.35 Chromatogramme GC-FID chiral de la térébenthine fournie par Westrock.....	51
Figure 1.36 Chromatogrammes GC-FID chiraux des lots d'acétate d'isobornyle (4) hydrolysés du partenaire Agrinova.....	54
Figure 1.37 Agrandissement de la région caractéristique des spectres RMN ¹ H des molécules étudiées dans la térébenthine commerciale « Solvable »	55
Figure 1.38 Spectre RMN ¹ H de la térébenthine brute	56
Figure 1.39 Superposition des spectres RMN ¹ H de la térébenthine brute (bleu) avec la térébenthine désodorisée à l'échelle laboratoire	57
Figure 1.40 Superposition des spectres RMN ¹ H de la térébenthine désodorisée à l'échelle pilote (vert) sur la térébenthine brute (bleu) et la térébenthine désodorisée à l'échelle laboratoire (rouge)	59
Figure 2.1 Structure chimique de l'isopropanol et du propanol.....	61
Figure 2.2 Structure chimique du α-pinène (1), β-pinène (2), camphène (3) et limonène (8)	61
Figure 2.3 Schéma réactionnel de l'isomérisation du α-pinène (1) tiré de la littérature ⁴⁸	62
Figure 2.4 Schéma réactionnel de l'isomérisation du α-pinène (1) en β-pinène (2)	63

Figure 2.5 Image MEB de la synthèse des nanotubes.....	65
Figure 2.6 Image MET d'un agrégat issu de la synthèse des nanotubes.....	66
Figure 2.7 Image MET du solide synthétisé.....	67
Figure 2.8 Spectre RMN ¹ H du mélange réactionnel à une heure de temps de contact	69
Figure 2.9 Conversion du α-pinène (1) en camphène (3) par les nanotubes de TiO ₂ à 100 °C.....	70
Figure 2.10 Analyse EDX des nanotubes TiO ₂ avant lavage	71
Figure 2.11 Analyse EDX des nanotubes TiO ₂ après lavage	72
Figure 2.12 Image MET des nanotubes après lavage acide	73
Figure 2.13 Conversion du α-pinène (1) en camphène (3) par Nanotubes TiO ₂ relavés avec HCl 0,1 mol/L	74
Figure 2.14 Image MET du solide après 24 heures de réaction dans NaOH à 150 °C de la poudre TiO ₂ rutile	75
Figure 2.15 Image MET du solide après 48 heures de réaction dans NaOH à 150 °C de la poudre TiO ₂ rutile	76
Figure 2.16 Conversion du α-pinène (1) par les nanotubes issus de l'oxyde de titane rutile à 120 °C.....	77
Figure 2.17 Conversion du α-pinène (1) en camphène (3) à 70 °C par Clinoptilolite traitée avec H ₂ SO ₄ 0,1 M	80
Figure 2.18 Étude de la charge catalytique sur la conversion du α-pinène (1) à 120 °C.....	81
Figure 2.19 Étude de la charge catalytique sur la conversion de la térébenthine à 120 °C.....	82
Figure 2.20 Conversions du α-pinène (1) et β-pinène (2) de la térébenthine à 120 °C sous charge catalytique de 3 %	83
Figure 2.21 Étude de la température sur la conversion du α-pinène (1) à 3 % de charge catalytique.....	84
Figure 2.22 Schéma générique d'un montage de chimie en flux continu.....	85
Figure 2.23 Système de chimie en continu assemblé	87
Figure 2.24 Colonnes HPLC contenant le catalyseur.....	88
Figure 2.25 Conversion du α-pinène (1) en camphène (3) avec nanotubes TiO ₂ à 100 °C par la chimie en continu.....	91
Figure 2.26 Conversion du α-pinène (1) en camphène (3) avec nanotubes TiO ₂ à 120 °C par la chimie en continu.....	92

Figure 2.27 Conversion du α -pinène (1) en camphène (3) avec nanotubes TiO_2 à 140 °C par la chimie en continu.....	93
Figure 2.28 Conversion de la térébenthine en camphène (3) avec nanotubes TiO_2 à 140 °C par la chimie en continu.....	94
Figure 2.29 Conversion de la térébenthine en camphène (3) - Chimie en continu à 140 °C sous un débit de 0.1 mL/min.....	95
Figure 2.30 Chromatogramme GC-FID chiral de la térébenthine isomérisée.....	96
Figure 2.31 Spectre RMN ^1H du camphène (3) (rouge) et d'une fraction considérée comme acceptable.	97
Figure 2.32 Chromatogramme d'une fraction de distillation majoritaire en camphène (3)	98
Figure 2.33 Mécanisme de l'estérification du camphène (3) catalysée par un acide de Brønsted	99
Figure 2.34 Spectre RMN ^1H du mélange à 1,0 équivalent d'acide acétique après 48 h à température ambiante.....	101
Figure 2.35 Estérification du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec différents équivalents d'acide acétique	102
Figure 2.36 Conversion du α -pinène (1) en acétate d'isobornyle (4) par voie directe	105
Figure 2.37 Spectre RMN ^1H de la conversion du α -pinène (1) avec les catalyseurs d'isomérisation et d'estérification combinés	106
Figure 2.38 Système de chimie en continu pour la réaction d'estérification	107
Figure 2.39 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique, 20 °C.....	110
Figure 2.40 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique, 40 °C puis 20 °C.....	111
Figure 2.41 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique, 60 °C puis 20 °C.....	112
Figure 2.42 Conversion du camphène en acétate d'isobornyle avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique à trois températures.....	113
Figure 2.43 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique, avec et sans ultrasons. T.a.....	114
Figure 2.44 Conversion du camphène en acétate d'isobornyle avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique - Ultrasons et 40 °C	115
Figure 2.45 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 1.5 eq acide acétique – chimie en continu, 40 °C puis 20 °C.....	116

Figure 2.46 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique, chimie en continu, 40 °C puis 20 °C sous un débit de 0.2 ml/min.....	118
Figure 2.47 Spectre RMN ¹ H du produit obtenu par extraction à l'heptane	120
Figure 2.48 Spectre RMN ¹ H du produit obtenu par extraction à l'acétate d'éthyle.....	121
Figure 2.49 Spectre RMN ¹ H du produit obtenu par extraction sans solvant.....	122
Figure 2.50 Spectre RMN ¹ H du produit obtenu par distillation	124
Figure 2.51 Chromatogramme GC-FID du produit obtenu par distillation	125
Figure 2.52 Chromatogramme du produit d'isomérisation du (+)- α -pinène (1).....	128
Figure 2.53 Chromatogramme du produit d'isomérisation du (-)- α -pinène (1)	129
Figure 2.54 Chromatogramme du produit d'isomérisation du (-)- β -pinène (2)	130
Figure 2.55 Mécanisme de l'isomérisation du α -pinène (1) et β -pinène (2) en camphène (3)	131
Figure 2.56 Chromatogramme de la racémisation du camphène (3)	132
Figure 2.57 Chemin synthétique chiral principal de l'isomérisation du α -pinène (1) et β -pinène (2) en camphène (3).....	133
Figure 2.58 Chromatogramme de l'acétate d'isobornyle (4) hydrolysé provenant de l'estérification du (+)-camphène (3).....	135
Figure 2.59 Chromatogramme de l'acétate d'isobornyle (4) hydrolysé provenant de l'estérification du (-)-camphène (3).....	136
Figure 2.60 Intermédiaire symétrique du camphène (3) déprotoné	137
Figure 2.61 Images miroirs de l'acétate d'isobornyle (4).....	137
Figure 2.62 Schéma du chemin synthétique chiral des réactions étudiées.....	138
Figure 2.63 Organigramme à remplir du processus de synthèse appliqué au α -pinène (1).....	140
Figure 2.64 Organigramme du processus de synthèse appliqué au α -pinène (1)	143
Figure 2.65 Organigramme du processus de synthèse appliqué à la térébenthine	146
Figure 2.66 Contribution des intrants au coût de production de l'acétate d'isobornyle (4)	152
Figure 3.1 Rapport d'élution de la séparation par système automatisé Biotage	160
Figure 3.2 Section des éprouvettes récoltées du rapport de l'appareil Biotage.....	161

Figure 3.3 Spectre RMN HSQC de la fraction # 1 obtenue après séparation sur silice C-18.....	164
Figure 3.4 Réduction de l'activité microbienne par les fractions isolées.....	169
Figure 3.5 Analyse RMN ¹ H de l'extrait #2 après échange de solvant	175
Figure 3.6 Spectre RMN HSQC de l'extrait # 1	178
Figure 3.7 Spectre RMN HSQC de l'extrait # 5	178
Figure 3.8 Réduction de l'activité microbienne après traitement avec les extraits.....	180
Figure 3.9 Réduction de l'activité microbienne par l'extrait au solvant à 100 °C suivant filtration	182
Figure 3.10 Spectre RMN ¹ H du résidu de filtration à 50 µm de l'extrait # 5.....	183
Figure 3.11 Organigramme du nouveau procédé d'extraction de l'agent antimicrobien	189
Figure 3.12 Organigramme de l'ancien procédé d'extraction de l'agent antimicrobien.....	196

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Molécules étudiées, énantiomères et numéros identificateurs CAS	11
Tableau 1.2 Propriétés physico-chimiques des molécules étudiées ²⁹	13
Tableau 1.3 Signaux caractéristiques des molécules étudiées	22
Tableau 1.4 Conditions d'analyse de la chromatographie en phase gazeuse.....	24
Tableau 1.5 Données de polarimétrie.....	40
Tableau 1.6 Temps de rétention GC-FID des énantiomères à l'étude	42
Tableau 1.7 Teneurs calculées par GC-FID chirale pour les molécules connues dans l'huile essentielle d'épinette noire fournie par Boréa	48
Tableau 1.8 Teneurs calculées par GC-FID chirale pour les molécules connues dans la térébenthine fournie par Westrock	52
Tableau 2.1 Signaux caractéristiques RMN ¹ H des molécules étudiées.....	68
Tableau 2.2 Résultats d'isomérisation par les catalyseurs alternatifs	79
Tableau 2.3 Temps de résidence en fonction du débit pour les nanotubes de TiO ₂	90
Tableau 2.4 Charges catalytiques des essais pour la voie de synthèse directe	104
Tableau 2.5 Temps de résidence en fonction du débit pour la résine Amberlyst 15	109
Tableau 2.6 Méthodes de purification de l'acétate d'isobornyle (4).....	125
Tableau 2.7 Teneurs énantiomériques des α -pinènes (1) et β -pinènes (2) commerciaux	127
Tableau 2.8 Teneurs énantiomériques des camphènes (3) commerciaux	134
Tableau 2.9 Réactifs et prix associés pour la synthèse de l'acétate d'isobornyle (4)	148
Tableau 2.10 Calcul des intrants pour la désodorisation, la confection des nanotubes de TiO ₂ et l'isomérisation	150
Tableau 2.11 Coûts pour synthétiser 1 kg de camphène (3).....	151
Tableau 2.12 Calcul des intrants pour l'estérification du camphène (3).	151
Tableau 2.13 Coûts pour synthétiser 1 kg d'acétate d'isobornyle (4)	152
Tableau 2.14 Coût de production annuelle de l'acétate d'isobornyle (4).....	154

Tableau 3.1 Programme d'élution de la séparation bioguidée.....	159
Tableau 3.2 Synthèse des séparations de l'extrait antimicrobien	162
Tableau 3.3 Familles de molécules identifiées par RMN HSQC suite à la séparation sur silice C-18.....	165
Tableau 3.4 Optimisation des conditions d'extraction de l'agent antimicrobien.....	172
Tableau 3.5 Famille des composés en présence dans les extraits 1 et 5 – Détermination par RMN HSQC	179
Tableau 3.6 Taux obtenus et estimés des réactifs, de l'énergie et de la main-d'œuvre	187
Tableau 3.7 Données énergétiques pour fin de calculs	188
Tableau 3.8 Étapes du nouveau procédé d'extraction et durée d'agitation.....	190
Tableau 3.9 Analyse technico-économique du nouveau procédé d'extraction de l'agent antimicrobien	193
Tableau 3.10 Comparaison des coûts d'extraction du nouveau procédé à différentes échelles	195
Tableau 3.11 Analyse technico-économique du procédé original d'extraction de l'agent antimicrobien	197
Tableau 3.12 Analyse technico-économique du procédé original d'extraction de l'agent antimicrobien – Suite.....	198
Tableau 3.13 Comparaison des coûts d'extraction du procédé original à différentes échelles	200
Tableau 3.14 Rapports des coûts de production entre l'ancien et le nouveau procédé aux différentes échelles.....	201

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

Ac : Acétyle

CAS : Numéro identificateur unique émis par le « Chemical Abstracts Services »

CIPC : Chlorprophame, molécule antigerminative utilisée au Québec pour les pommes de terre

CRPTQ : Consortium de Recherche sur la Pomme de Terre du Québec

δ chimique : Déplacement chimique en partie par million

Et : Éthyle

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

GC-FID : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur par induction de flamme

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance. De l'anglais « High Performance Liquid Chromatography »

HSQC : Correlation hétéronucléaire quantique simple. De l'anglais « Heteronuclear Single Quantum Correlation »

MS : Spectroscopie de masse

PTFE : Polytétrafluoroéthylène, communément appelé sous son appellation commerciale Teflon™

RDA : Subvention de Recherche et Développement Appliquée

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

T.a. : Température ambiante (20 °C ± 1 °C)

UQTR : Université du Québec à Trois-Rivières

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

CFU/UFC : Unité Formant Colonie tiré de l'anglais « Colony Forming Unit »

cm : Centimètre

deg : Degrés

eq : Équivalents molaires

g : Gramme

H : Heure

kg : Kilogramme

kWh : Kilowatt heure

kV : Kilovolt

L : Litre

M : Masse molaire

mg : Milligramme

mL : Millilitre

mm : Millimètre

mol : Nombre de moles

N : Normalité

pA*s : Unités d'aire du pic en chromatographie gazeuse

ppm : Parties par millions

rpm : Tours par minute. Tiré de l'anglais « Rotation per minute »

T.a. : Température ambiante (20 °C)

% v/v : Pourcentage volume/volume

\$: Dollars Canadien

°C : Degré Celsius

W : Watt

RÉSUMÉ

La conservation des aliments est une priorité avec la population toujours grandissante. La pomme de terre, pierre angulaire de l'alimentation dans de nombreux pays, est cultivée en quantité et doit être stockée entre le moment de sa récolte et sa vente ou sa transformation. Deux problèmes sont rencontrés lors du stockage soit la germination hâtive et l'apparition de pourriture. Ces deux phénomènes sont connus et des traitements sont couramment appliqués. Cependant, l'utilisation du chlorprophame, molécule antigerminative utilisée en Amérique du Nord, a été bannie en Europe en 2020 pour des raisons de sécurité. Ceci crée un problème pour l'exportation des produits de la pomme de terre canadienne. Un produit de remplacement, ne posant aucun danger de sécurité, se doit d'être développé. Un composé actif, issu de la transformation chimique de la térébenthine nord-américaine a été synthétisé selon les principes de la chimie en flux continu pour une mise à l'échelle facilitée. En contact avec un catalyseur solide facilement synthétisable et potentiellement réutilisable, les constituants principaux de la térébenthine sont isomérisés en camphène (3). Celui-ci est à son tour estérifié en acétate d'isobornyle (4) en présence d'acide acétique et d'un catalyseur acide sur support polymérique commercialement disponible. Après purification, un produit de haute pureté est obtenu. Le cumulatif des rendements a démontré qu'à partir d'un kilogramme de térébenthine désodorisée, il est possible d'obtenir 0,55 kg de camphène (3) qui peut à son tour être estérifié en 0,67 kg d'acétate d'isobornyle (4). En plus de l'agent antigerminatif développé et dans le but de contrer les maladies attaquant les pommes de terre durant le stockage, un extrait antimicrobien, obtenu à l'issue d'un projet précédent, a été amélioré et optimisé. Le projet présent visait à fractionner cet extrait et d'en identifier les fractions présentant une activité antimicrobienne. Le procédé d'extraction a quant à lui été amélioré, son efficacité à tuer les organismes nuisibles a été déterminée et son avantage financier a été évalué afin de convaincre les partenaires industriels pour une mise à l'échelle et une commercialisation éventuelle.

Mots clés : Biomimétisme, chimie verte, synthèse organique, antigerminatif, antimicrobien, extraction, biomasse forestière, chimie en flux continu, économie circulaire

ABSTRACT

With an ever-increasing world population, food storage and preservation are issues which must be tackled. Potatoes are the cornerstone of the food supply in many countries. It is cultivated in large quantities and must be stored between harvest and processing. Two main issues are encountered during storage, namely early sprouting and rot. These phenomena are well-known sources of loss of product and treatments are commonly applied to counter them. However, chlorpropham, a sprout suppressant molecule used in North America has been banned by the European Union in 2020 because of health concerns. This poses a problem for exports of the transformed products obtained from Canadian potatoes. A replacement compound, posing no threat to health and safety, has to be developed. An active compound derived from the chemical transformation of North American turpentine has been synthesized following flow chemistry principles for a fast-tracked scale-up. When in contact with a synthesized and potentially reusable solid-state catalyst, the main components of turpentine are isomerized to camphene. This camphene is in turn esterified into isobornyl acetate in presence of acetic acid and a commercially available, polymer supported acid catalyst. After purification, a high purity compound is recovered. The cumulative reactions yield 0,67 kg of isobornyl acetate (4) obtained per 0,55 kg of camphene (3) extracted from the isomerization of 1 kg of deodorized industrial turpentine. Additionally, rot can take hold in the flesh of potatoes during storage and antimicrobial agents must be used to prevent it. An active extract issued from a previous project was optimized. The current project aimed to fraction this provided extract and to identify the active recovered parts. The extraction process was optimized and its efficiency in killing the undesired organisms was confirmed. The financial and operational advantages of the new extraction process were calculated to give investors data for a potential commercialization.

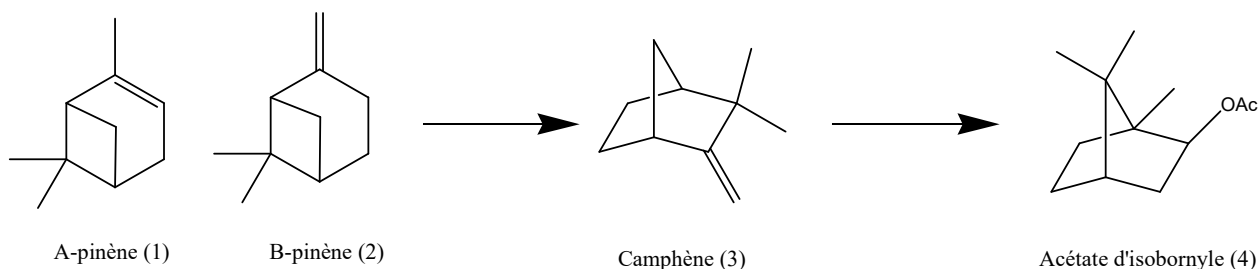
Keywords: Biomimetism, green chemistry, organic synthesis, sprout suppressant, antimicrobial, extraction, forest biomass, flow chemistry, circular economy

INTRODUCTION

La population mondiale a triplé en seulement 70 ans grâce aux avancées technologiques et médicales telles que les antibiotiques, les vaccins et les meilleures conditions sanitaires. Bien que cette augmentation soit estimée ralentir dans les décennies à venir, rien n'indique qu'elle s'arrêtera ou même se renversera.¹ C'est dans ce contexte de population toujours grandissante que la production de nourriture et sa conservation, afin de réduire le gaspillage alimentaire, prend tout son sens. Ce dernier est un fléau causant la destruction de millions, voire de milliards de tonnes d'aliments chaque année de par le monde.² Chaque région géographique mondiale possède ses aliments de base, selon son climat, qui fournissent des nutriments à sa population. Par exemple, le riz, le blé et le maïs sont tous des produits consommés en grande quantité, sous leur forme originelle ou transformée. Il n'est pas déplacé d'affirmer qu'au Canada et dans de nombreux pays nordiques, la pomme de terre est une de ces pierres angulaires de l'alimentation. On la retrouve en vente dans les marchés d'alimentation, mais aussi sous d'innombrables formes transformées. Frites, croustilles, vodka, cuites au four et en purée ne sont que quelques-unes des façons de consommer cet aliment riche en vitamines, minéraux et glucides. À l'international, lorsque le sujet tourne sur la cuisine du Canada, la poutine est inévitablement évoquée. Quel canadien ne s'est jamais fait parler de la poutine, lorsqu'il discute avec des gens provenant de pays étrangers ? Ce plat, exporté jusqu'à Bangkok en Thaïlande, fait la renommée du pays et est synonyme de décadence pour les initiés.³ La pomme de terre nécessaire pour la vente et la transformation est cultivée en quantité importante au Canada. En 2024, plus de 128 millions poids de cent livres, ou 5,8 millions de tonnes de pommes de terre, toutes variétés confondues, ont été récoltées.⁴ Ces pommes de terre, récoltées en automne, ne peuvent être transformées immédiatement. Elles doivent alimenter les nombreuses usines de transformation qui opèrent tout au long de l'année. Elles doivent donc être stockées et conservées durant des mois dans des entrepôts dédiés. Durant cet entreposage, le tubercule entre premièrement en dormance pour une période et viendra à se réveiller selon les conditions (température, humidité, etc.). Cette durée dépend des variétés, mais ultimement, cet éveil est inévitable. Lorsque la pomme de terre se réveille, elle cherchera l'eau et les nutriments en vue de germer, croître en plant, fleurir et finalement, produire d'autres tubercules, perpétuant le cycle de cette espèce. Malheureusement, durant cet entreposage, des problématiques peuvent être rencontrées qui mèneront à la perte des tubercules. Les tubercules affectés devront être retirés et jetés pour ne pas contaminer le reste de la récolte. La germination hâtive est un de ces problèmes affectant l'industrie agroalimentaire. En effet, les pertes enregistrées en entrepôt peuvent s'élever jusqu'à environ 8 % annuellement.⁵ Des produits antigerminatifs existent depuis longtemps sur

le marché. Par exemple, on retrouve le 1,4-diméthylnaphtalène commercialisé sous la marque *Dormfresh*tm, le *Smartblock* ou déc-3-én-2-one, l'éthylène, les huiles essentielles de clou de girofle, d'orange, ou d'épinette noire et enfin, le chlorprophame ou CIPC. Tous ces produits sont d'origine synthétique excepté les huiles essentielles, mais n'agissent pas de la même façon pour retarder la germination. L'éthylène et le 1,4-diméthylnaphtalène sont appliqués afin de conserver la pomme de terre dans un état de dormance et doivent être appliqués régulièrement.^{6 7} Lorsque celle-ci commence à germer, soit parce que les conditions de stockage sont propices ou parce que le délai d'application de ces traitements a été dépassé, ils ne seront plus efficaces. C'est ici qu'entrent en jeu les autres produits afin de brûler les germes naissants. Le déc-3-én-2-one, le chlorprophame et les huiles essentielles fonctionnent sur ce principe.^{8 9} Ils sont appliqués périodiquement selon l'état de la germination pour éliminer les germes et ainsi préserver le tubercule. Il s'écoulera quelques semaines ou mois entre les applications selon les conditions d'entreposage et les variétés. Tous ces produits présentent des avantages, mais aussi certains inconvénients. Par exemple, le CIPC et *Smartblock* sont très toxiques pour l'humain lors de l'application.¹⁰ Les huiles essentielles sont sécuritaires au niveau de la toxicité, mais peuvent s'avérer inflammables lors de la vaporisation et sont très coûteuses étant donné leur méthode de production et les quantités de matière nécessaires. De plus, en 2020, le CIPC, produit utilisé en grande quantité pour traiter les pommes de terre au Canada, a été banni par l'Union européenne.¹¹ Cette motion stipule, en résumé, que puisque le CIPC est reconnu comme ayant des effets toxicologiques sur l'humain, la décontamination complète ne peut être effectuée avant la vente. Le principe de précaution primant afin d'assurer la santé des consommateurs, l'utilisation de cet herbicide est interdite, malgré qu'il soit autorisé aux États-Unis et au Canada. L'Union européenne étant habituellement à l'avant-garde en matière de santé et de réglementations, il est raisonnable de supposer que cette interdiction traversera éventuellement l'Atlantique pour gagner l'Amérique du Nord. C'est dans cette optique que ce projet a vu le jour. Un nouveau traitement à utiliser seul ou en combinaison avec un autre, devait être développé afin de répondre aux besoins des agriculteurs. Les traitements alternatifs existants attaquant les germes ont été considérés, mais les problématiques associées à ceux-ci, telles que la toxicité du déc-3-én-2-one, même relativement faible, ont fait en sorte que l'attention s'est plutôt tournée vers des produits d'origine naturelle comme les huiles essentielles. Au Canada, la superficie forestière s'étend sur 347 millions d'hectares ce qui représente environ 9 % de la superficie mondiale en forêt. De ces 347 millions d'hectares, près de 68 % sont composés uniquement de conifères se situant majoritairement dans la forêt boréale.¹² L'huile essentielle d'épinette noire (*Picea Mariana*), produit déjà connu comme antigerminatif, s'avérait tout à fait appropriée pour remplacer le CIPC.¹³ Cependant, les quantités d'huiles extraites au Canada sont

beaucoup trop faibles pour subvenir aux besoins de cette industrie et traiter les quelque six millions de tonnes de pommes de terre récoltées annuellement. Lors d'un projet précédent réalisé conjointement par Innofibre et l'Université du Québec à Trois-Rivières, la composition de l'huile essentielle d'épinette noire a été déterminée. Les molécules identifiées lors de cette étude non publiée ont été achetées à l'état pur et leur activité antigerminative a été évaluée. Le principal produit actif était l'acétate de bornyle (5), constituant environ 25 % de la masse de l'huile essentielle d'épinette noire. Il a donc été envisagé de synthétiser cette molécule chimiquement. La synthèse ou l'extraction de ce produit sont bien connues de la littérature, mais lors de l'application d'un plan rétrosynthétique, la littérature a démontré que l'acétate d'isobornyle (4), diastéréoisomère de l'acétate de bornyle (5), serait la molécule obtenue.^{14 15} Cette molécule a donc été testée et s'est avérée être aussi efficace comme agent antigerminatif que l'acétate de bornyle (5) lors des travaux précédemment réalisés, mais non publiés, par l'équipe de projet. Ce produit est aussi déjà synthétisé dans l'industrie chimique et est utilisé dans l'industrie agroalimentaire comme additif alimentaire ou dans les cosmétiques.¹⁶ Afin de choisir, lequel des diastéréoisomères serait préférable, certains critères devaient cependant être respectés pour la synthèse de ce nouveau produit. En concordance avec les principes de l'économie circulaire et de la chimie verte, la matière première devait provenir d'un résidu industriel disponible au pays, de la biomasse ou le cas échéant, d'une source renouvelable et non pétrolière ou synthétique. De plus, l'application de la chimie en continu, concept bien ancré dans l'industrie chimique, mais relativement nouveau en chimie de laboratoire, serait utilisée afin d'accélérer une mise à l'échelle potentielle. En croisant les données obtenues dans la littérature, les responsables du projet ont à ce stade sélectionné une synthèse produisant l'acétate d'isobornyle (4) à partir de α -pinène (1) et β -pinène (2) en passant par un intermédiaire soit le camphène (3). Le schéma réactionnel général des synthèses sélectionnées est présenté ci-dessous :



Les pinènes sont les constituants principaux de la térébenthine produite en tant que sous-produit, par l'industrie des pâtes et papiers très implantée au pays. Puisque les pinènes constituent environ 80 % de la masse de la térébenthine, l'utilisation de ce résidu était tout à fait justifiée. De plus, la réduction des rejets pour en faire des produits à valeur ajoutée, en accord avec les principes de la chimie verte, est louable afin de réduire notre dépendance aux composés pétroliers et ainsi amoindrir l'impact des activités humaines sur le climat. Suivant cette ligne directrice, le plan du projet a été élaboré. Les objectifs de ce volet du projet ont été posés par l'équipe de projet et les professeurs universitaires.

Objectifs volet antigerminatif :

- Synthétiser l'acétate d'isobornyle (4) comme agent antigerminatif.
- Étudier les paramètres critiques des synthèses proposées.
- Développer un procédé de synthèse en prévision d'une mise à l'échelle.
- Réaliser une production d'acétate d'isobornyle (4) comme preuve de concept.
- Évaluer les coûts des intrants pour la production de l'acétate d'isobornyle (4).

Certains critères devaient être respectés dans l'atteinte de ces objectifs dont :

- Synthétiser le produit désiré à partir de résidus forestiers soit la térébenthine.
- Mettre en œuvre la chimie en continu dans la synthèse proposée.
- Appliquer les 12 principes régissant la chimie verte lorsque possible.¹⁷

Pour atteindre les objectifs, le travail qui sera réalisé a été fractionné en étapes précises :

- Obtenir et caractériser les molécules impliquées dans cette étude par différentes méthodes.
- Déterminer la composition des huiles essentielles disponibles au Canada ayant une activité antigerminative ainsi que la composition de la térébenthine.
- Prétraiter la térébenthine avant d'entreprendre les transformations chimiques.
- Étudier la réaction d'isomérisation du α -pinène (1) et β -pinène (2) en camphène (3) en lot et en flux continu.
- Étudier la réaction d'estérification du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) en lot et en flux continu.
- Démontrer la faisabilité du procédé de synthèse en flux continu.
- Évaluer le coût des intrants pour la production de l'acétate d'isobornyle (4) à l'échelle industrielle.

Dans un premier temps, les molécules impliquées dans cette synthèse, tant au niveau des réactifs que des produits ont été obtenues commercialement et analysées. Au besoin, des méthodes d'analyse ont été développées afin de caractériser convenablement les mélanges réactionnels à l'étude. À l'aide des informations analytiques obtenues, les composés de départ ont été caractérisés, notamment la térébenthine industrielle. Au besoin, des prétraitements seraient appliqués afin d'obtenir une matière première la plus pure possible. Dans un deuxième temps, les synthèses ont été étudiées. Les étapes d'isomérisation et d'estérification subséquente ont été réalisées en batch afin de bien maîtriser les différents paramètres impliqués. Ensuite, les synthèses ont été transposées à la chimie en continu où les paramètres synthétiques ont été ajustés afin d'optimiser la synthèse et le rendement. Cette étape d'adaptation à la chimie en flux continu est cruciale afin de tirer pleinement avantage des caractéristiques propres à la technique. La chimie en flux continu permet de réduire les dangers inhérents des produits utilisés comme l'inflammabilité ou la toxicité puisque la réaction n'est réalisée que sur un petit volume à tout moment. De plus, la stabilité de la chimie en continu permet d'éliminer l'effet de lots contrairement à une synthèse classique en lot. Le lot obtenu est unique et ne varie pas tant que les conditions sont stables. Enfin, les conditions sont mieux contrôlées comme le chauffage et le temps de mélange, résultant en un contrôle accru sur le rendement et les impuretés produites. À l'aide des informations récoltées à ce point, une preuve de concept du procédé développé a été réalisée afin de démontrer la faisabilité d'une production industrielle basée sur les conclusions de cette étude. Finalement, une courte étude technico-économique a été effectuée dans le but de démontrer la viabilité économique du processus établi.

En plus de la germination hâtive, les pommes de terre sont sujettes à plusieurs maladies lors de leur entreposage. Celles-ci causent la pourriture molle ou sèche sur le tubercule et les rendent impropres à la transformation ou à la vente au détail tout au long de l'année.¹⁸ Certains traitements existent déjà, mais ne sont pas efficaces contre certaines souches de maladies bactériennes ou encore présentent des désavantages notoires tels la toxicité ou même au niveau de la performance.¹⁹ De plus, la résistance croissante aux traitements usuels constitue un obstacle majeur pour le futur de la même façon que la résistance aux antibiotiques est préoccupante en médecine.²⁰ Des traitements comme Stadium®, Mertect® ou Phostrol™ sont disponibles sur le marché, mais ces fongicides sont souvent toxiques pour l'environnement et la nappe phréatique en plus d'affecter les souches de maladies visées.²¹ L'utilisation de traitements à spectre large, issus de la biomasse est avantageuse sur plusieurs plans. Cela permet de remplacer les traitements de nature synthétique qui peuvent s'avérer nocifs pour l'environnement en s'accumulant dans le sol et les eaux.^{22, 23} De plus, il s'agit d'une intéressante avenue de valorisation de la biomasse québécoise, par l'extraction de molécules à valeur ajoutée, avant que le résidu soit envoyé à la génération d'énergie.

C'est pourquoi le projet vise à développer un traitement antimicrobien agissant sur les principales sources de maladies provoquant les pertes, dont *Solanum tuberosum L*, *Pectobacterium carotovorum*, *Fusarium Oxysporum* et *Fusarium graminearum* pour n'en nommer que quelques-unes.¹³ Ce traitement devra être issu de la biomasse forestière, sans danger pour l'être humain et peu coûteux à produire. Un premier processus d'extraction a déjà été développé lors d'études précédentes par Michelle Boivin.²⁴ Les objectifs de ce volet sont élaborés comme suit :

Objectifs volet antimicrobien :

- Fractionner l'extrait antimicrobien et caractériser ses différentes fractions.
- Optimiser l'extraction de l'agent antimicrobien pour une mise à l'échelle éventuelle.
- Appliquer une analyse technico-économique aux procédés d'extraction.

Pour atteindre les objectifs, le travail qui sera réalisé a été fractionné en étapes précises :

- Fractionnement de l'agent antimicrobien par séparation bioguidée.
- Détermination des familles de molécules responsables de l'activité antimicrobienne.
- Optimisation de l'extraction et évaluation de l'activité antimicrobienne du nouvel extrait.
- Élaboration de la stratégie de l'analyse technico-économique.
- Collecte des données pertinentes qui serviront aux calculs.
- Évaluation du coût de production de l'extrait antimicrobien selon le procédé original et le procédé optimisé.
- Comparaison des coûts de production selon les procédés et émission des recommandations.

Le procédé développé sera étudié sous plusieurs aspects. Notamment, la composition de l'extrait isolé sera établie au meilleur des techniques et du temps disponible. Son activité antimicrobienne sera caractérisée et suivie tout au long du projet. Une optimisation préliminaire du processus d'extraction sera réalisée en vue d'une production pilote au courant de la suite du projet et finalement, une étude technico-économique sommaire sera effectuée afin d'évaluer l'avantage économique que présente le procédé d'extraction comparativement au procédé original. Un ensemble de méthodes et techniques seront mises à contribution dont la séparation chimique sur colonne de silice, les analyses de microbiologie par fluorescence et les extractions chimiques sous chaleur et pression. Ce développement impliquera aussi des concepts provenant de multiples disciplines dont l'ingénierie, la microbiologie et la chimie. Lorsque les compétences dépasseront la portée du présent projet, des experts et expertes dans leur domaine respectifs seront impliqué(e)s afin d'assurer l'exactitude des résultats et des méthodes utilisées pour y parvenir.

CHAPITRE 1

Travail préparatoire

Dans ce chapitre, les outils nécessaires aux caractérisations et suivis de réaction seront développés. Ces informations seront utilisées afin de caractériser les réactifs lors des réactions du chapitre 2. Premièrement, la liste des molécules, isomères et énantiomères sera dressée. Lorsque les molécules disponibles commercialement seront reçues, les analyses initiales pourront procéder. Notamment, les spectres infrarouges seront obtenus pour fins d'identification. Ensuite, les spectres RMN du proton dans le chloroforme deutéré seront acquis. Ces spectres sont caractéristiques aux molécules, mais ne permettent pas de différencier les énantiomères. Afin de compléter l'étude, une méthode de chromatographie chirale en phase gazeuse sera développée et les énantiomères pourront être différenciés et quantifiés. Certaines de ces informations sont disponibles dans la littérature, mais aucune étude complète et standardisée n'existe. Les données sont disparates, obtenues avec différentes méthodes et difficiles à relier entre elles. Avec les outils en main, les produits commerciaux pertinents, dont la térébenthine, seront analysés afin de connaître leur composition exacte. Finalement, la térébenthine, matière première dans les réactions prévues, sera prétraitée à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote.

1.1 Caractérisation des molécules à l'étude

Dans le but de pouvoir identifier correctement les molécules obtenues à la suite des réactions chimiques qui seront effectuées, il était impératif d'être bien préparés en connaissant les propriétés physico-chimiques et les empreintes RMN et FTIR caractéristiques des molécules étudiées. Quant à la chromatographie en phase gazeuse, l'appareil disponible était un chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à induction de flamme (GC-FID). Ce détecteur ne pouvant identifier les molécules par une banque de données comme aurait pu le faire la spectroscopie de masse, il faudra connaître les temps de rétention de chacune afin de confirmer son identité et la quantifier adéquatement. Le plan de recherche élaboré visait à utiliser la térébenthine d'épinette noire, contenant majoritairement ²⁵ du α -pinène (1) et β -pinène (2) afin de les convertir par isomérisation en camphène (3). Ce camphène (3) serait à son tour estérifié en présence d'acide acétique en acétate de bornyle (5) ou d'isobornyle. Les mécanismes respectifs seront discutés dans les sections portant sur chacune des réactions au chapitre 2. Il est à noter que le α -pinène (1), le β -pinène (2), le camphène (3), l'acétate de bornyle (5) et d'isobornyle comporte toutes des énantiomères ou images miroirs non superposables, ce qui en font des molécules chirales ayant un ou même deux centres chiraux. ^{26 27 28} Les molécules à l'étude sont présentées aux figures 1.1 à 1.5 :

α -pinène :

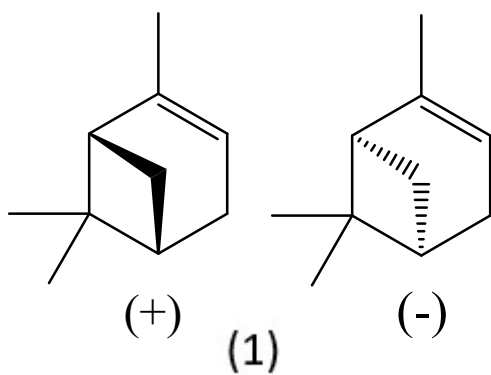


Figure 1.1 Structure chimique des énantiomères du α -pinène (1)

β -pinène (2) :

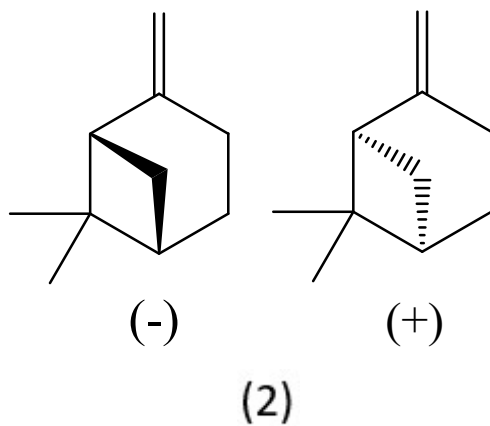


Figure 1.2 Structure chimique des énantiomères du β -pinène (2)

Camphène (3) :

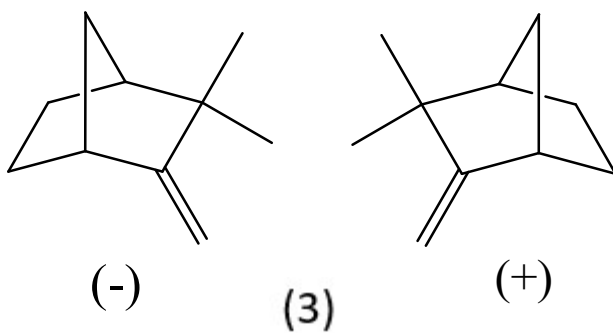


Figure 1.3 Structure chimique des énantiomères du camphène (3)

Acétate d'isobornyle (4) :

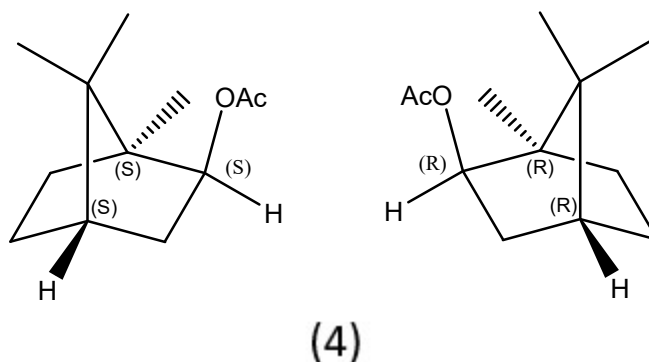


Figure 1.4 Structure chimique des énantiomères de l'acétate d'isobornyle (4)

Acétate de bornyle (5) :

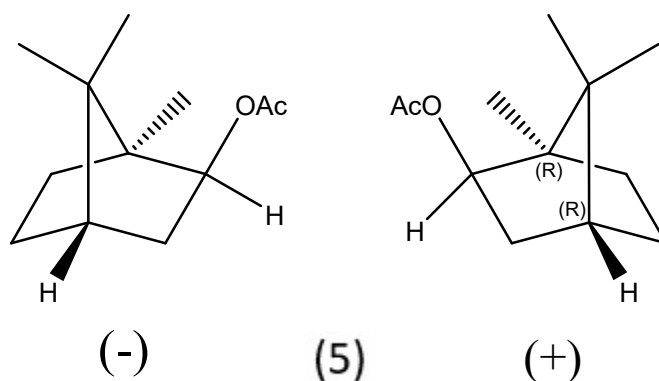


Figure 1.5 Structure chimique des énantiomères de l'acétate de bornyle (5)

Le α -pinène (1), β -pinène (2) et camphène (3) sont tous des isomères de constitution puisqu'ils ont la même formule empirique, mais différent par leur structure tridimensionnelle. De la même façon, l'acétate de bornyle (5) et l'acétate d'isobornyle (4) sont des diastéréoisomères puisque seule l'orientation du groupement acétate change entre les deux molécules. Ils possèdent chacun des énantiomères qui feront courber la lumière polarisée d'un côté ou de l'autre, ce qui leur conférera un signe positif ou négatif selon les conventions de la polarimétrie. À ce stade, l'analyse sur un polarimètre ne sera pas réalisée sur les produits purs puisqu'ils sont déjà caractérisés par les fournisseurs.

1.1.1 Approvisionnement et propriétés physico-chimiques

Il fallait tout d'abord se procurer les molécules de l'étude à l'état pur afin d'éviter toute interférence par des impuretés. Chaque énantiomère possède un numéro de CAS unique et il faut s'assurer de ne pas les confondre. Une liste des énantiomères disponibles et de leur numéro CAS a été établie et est présentée au tableau 1.1 :

Produit	Conformation	# CAS
α -pinène (1)	+	7785-70-8
	-	7785-26-4
	Racémique	80-56-8
β -pinène (2)	+	19902-08-0
	-	18172-67-3
	Racémique	127-91-3
Camphène (3)	+	5794-03-6
	-	5794-04-7
	Racémique	79-92-5
Acétate d'isobornyle (4)	Racémique (S,S,S / R,R,R)	125-12-2
Acétate de bornyle (5)	(-) / (1R,2R,4S)	5655-61-8
	(+) / (1R,2S,4R)	20347-65-3
	Racémique	76-49-3

Tableau 1.1 Molécules étudiées, énantiomères et numéros identificateurs CAS

Le tableau 1.1 présente les molécules, leurs énantiomères connus ainsi que les numéros de CAS associés. Lors des achats, ces numéros d'identification uniques assureront de se procurer le bon produit. Une recherche dans l'inventaire de Kemitek et d'Innofibre a révélé la présence de plusieurs molécules en stock et ceux-ci ont été utilisés sans besoin d'en racheter. Les autres produits qui n'étaient pas en stock ont dû être commandés chez les fournisseurs habituels, notamment chez Sigma-Aldrich. Certains produits plus rares ont été trouvés chez Parchem, mais ce dernier n'ayant pas répondu aux demandes de soumission, le projet a procédé sans certains énantiomères. Pour finir, trois molécules n'ont pu être obtenues commercialement soit le (+)- β -pinène (2), le (-)-camphène (3) et le (+)-acétate de bornyle (5). Quant à l'acétate d'isobornyle (4), les énantiomères séparés n'ont pu être trouvés. Il semble toujours se présenter sous la forme racémique avec le numéro CAS 125-12-2.

En combinant les données tirées des fiches signalétiques, les informations disponibles sur les pages respectives des produits et les ouvrages de référence comme le Merck Index, il est possible d'obtenir les propriétés physico-chimiques comme la masse molaire, les températures de fusion, d'ébullition et la densité. Les données récoltées sont présentées au tableau 1.2 :

Produit	Conformation	# CAS	Propriétés physico-chimiques			
			Masse molaire	Température de fusion	Température d'ébullition	Densité
			(g/mol)	(°C)	(°C)	(g/ml)
α-pinène (1)	+	7785-70-8	136,234	-63	156-157	0,858
	-	7785-26-4				
	Racémique	80-56-8				
β-pinène (2)	+	19902-08-0	136,234	-61,5	165-167	0,860
	-	18172-67-3				
	Racémique	127-91-3				
Camphène (3)	+	5794-03-6	136,234	48-52	158-160	0,850
	-	5794-04-7				
	Racémique	79-92-5				
Acétate d'isobornyle (4)	Racémique (S,S,S ou R,R,R)	125-12-2	196,29	29	229-233	0,984
Acétate de bornyle (5)	(-) / (1R,2R,4S)	5655-61-8	196,29	27-29	223-224	0,986
	(+) / (1R,2S,4R)	20347-65-3				
	Racémique	76-49-3				

Tableau 1.2 Propriétés physico-chimiques des molécules étudiées ²⁹

Les propriétés telles que les températures d'ébullition et la densité pourront s'avérer utiles lors des purifications des réactions respectives. Par exemple, l'écart entre les points d'ébullition d'un réactif et d'un produit pourra nous orienter sur la possibilité ou non d'utiliser la distillation pour les séparer. Tous les produits, sauf le camphène (3) sont des liquides à température ambiante, et ce même si l'acétate de bornyle (5) et d'isobornyle ont des points de fusion légèrement au-dessus de 25 °C. Le camphène (3) est quant à lui un solide cireux et devra être chauffé afin de le transférer efficacement.

1.1.2 Spectres infrarouges

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) fournit une empreinte permettant d'identifier les molécules. Avec l'appareil Cary FTIR 630 de Agilent Technologies (annexe A, entrée 2), les spectres infrarouges des produits commerciaux ont été obtenus (annexe A, entrée 1). Il est à noter que cette méthode ne permet pas de différencier les énantiomères l'un de l'autre. La méthode FTIR se basant sur l'absorption d'énergie par des liaisons, il n'y aura aucune différence entre le (+)- α -pinène (1) et le (-)- α -pinène (1) puisque les mêmes liaisons sont présentes dans les deux molécules, et seule l'orientation des liens dans l'espace varie. Le spectre FTIR du α -pinène (1) racémique est présenté à la figure 1.6 :

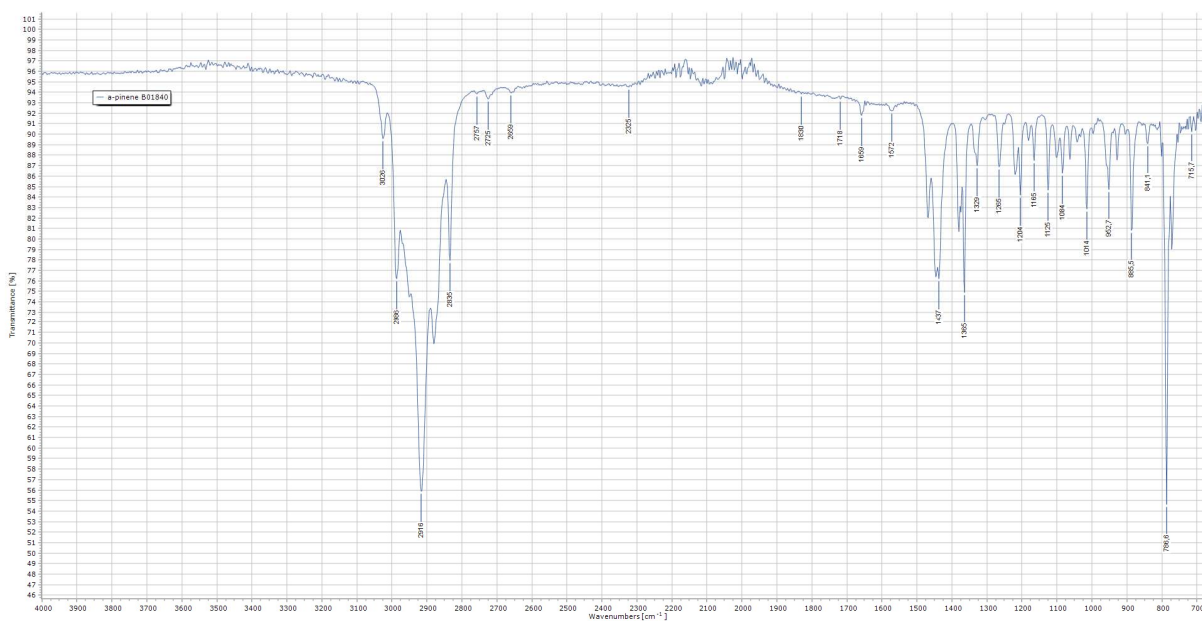


Figure 1.6 Spectre FTIR du α -pinène (1) racémique

En comparaison, le spectre FTIR du (-)- β -pinène (2) est présenté à la figure 1.7 :

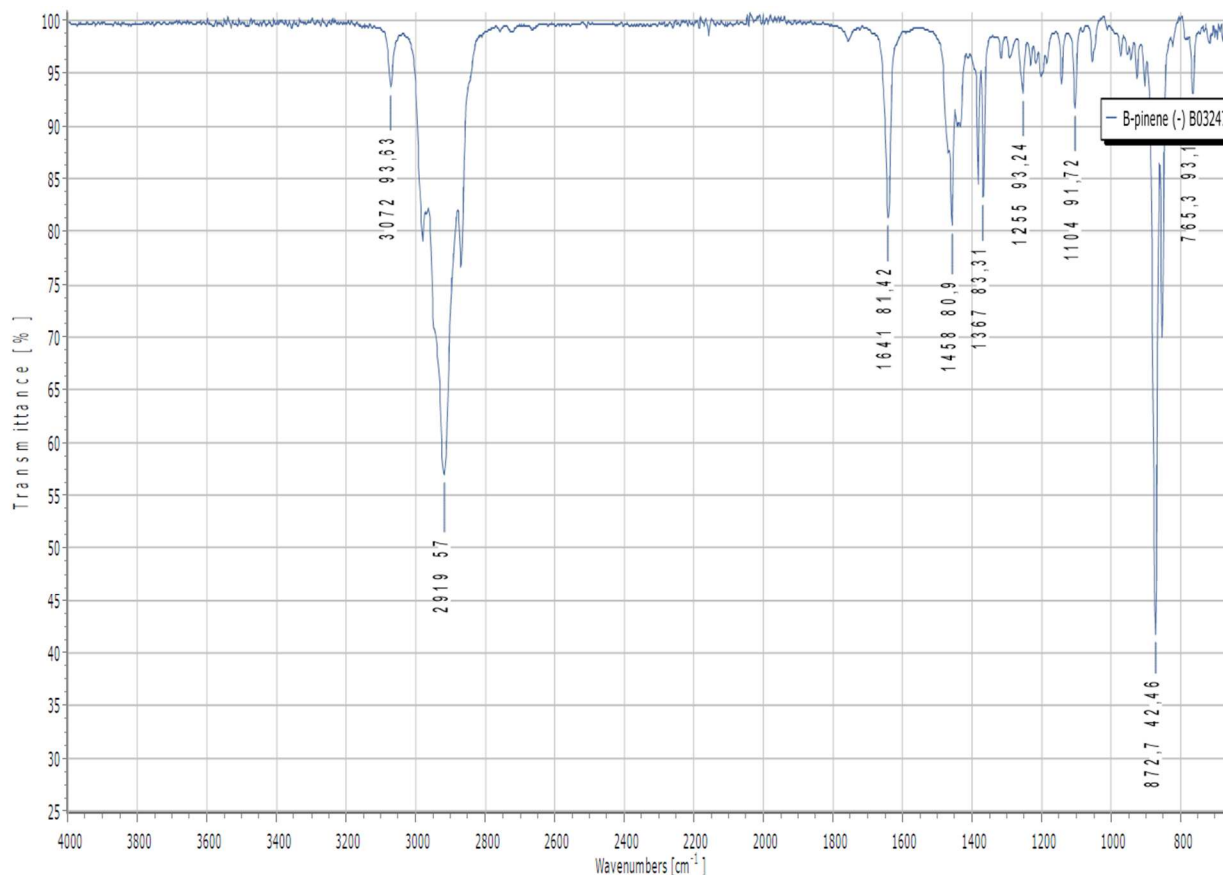


Figure 1.7 Spectre FTIR du (-)- β -pinène (2)

Les spectres FTIR du α -pinène (1) et β -pinène (2) sont caractéristiques des molécules. Ceci est attendu puisqu'il s'agit de molécules ayant les mêmes types de liens, mais dans une configuration différente. Il est donc possible de les différencier seulement par leur spectre infrarouge. Au besoin, cette technique sera mise à contribution dans la suite des travaux.

Les spectres FTIR du camphène (3), de l'acétate de bornyle (5) et l'acétate d'isobornyle (4) peuvent être consultés à l'annexe B dans la section 1.1. Cette méthode sera utilisée afin d'identifier des molécules et non de les quantifier. L'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (^1H) est beaucoup plus rapide et la quantification peut être aisément extraite du spectre.

1.1.3 Spectres de résonance magnétique nucléaire

De la même manière que la spectroscopie FTIR, les spectres RMN du proton des molécules à l'étude ont été acquis sur le spectromètre RMN Fourier 300 de Bruker (annexe A, entrée 3). Tel que pour les spectres infrarouges, ces analyses ne permettent pas d'observer des signaux distincts pour des énantiomères. Il sera impossible de différencier le (+)-camphène (3) du (-)-camphène (3) par exemple. Cependant, dans le cas de diastéréoisomères, soit des molécules comportant deux centres chiraux tels que les acétates de bornyle et d'isobornyle, une différence dans les spectres devrait être observée. En effet, puisque la RMN se base non seulement sur les groupements présents dans une molécule, mais aussi leur position relative l'un par rapport à l'autre. Il devrait donc y avoir une différence dans les déplacements chimiques et les constantes de couplage ainsi que la multiplicité des deux esters étudiés. Suivant le même principe, il serait raisonnable de s'attendre à une différence entre le α -pinène (1), le β -pinène (2) et la camphène (3) puisque ceux-ci diffèrent par la position des groupements. Le spectre du α -pinène (1) est présenté à la figure 1.8 :

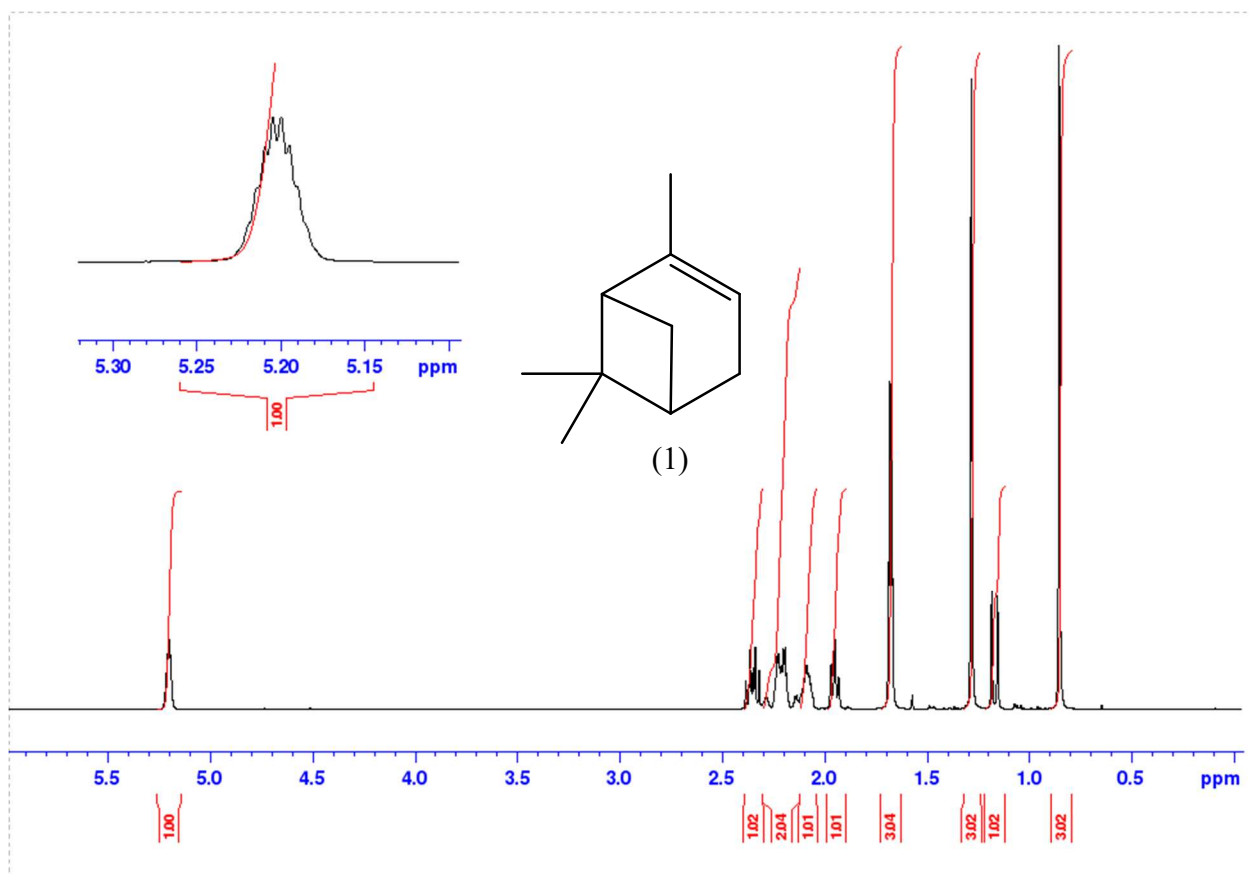


Figure 1.8 Spectre RMN ^1H du α -pinène (1) racémique

Une fois l'intégration réalisée, le total des signaux des protons s'élève à 16. Ceci est conséquent avec la structure qui comporte trois groupements CH₃, deux groupements CH₂ et trois groupements CH. Les groupements méthyles sont représentés par les singulets intégrant pour une valeur de 3. Ensuite, les protons sur le cycle ainsi que le pont présentent des signaux entre 1 et 2,4 ppm. Le signal à 5,2 ppm, dans l'encadré, est le proton lié au carbone de la double liaison en cycle. Ce signal est caractéristique au α -pinène (1) et servira de repère lors des analyses.

Chacune des molécules présentera un signal caractéristique en RMN (en agrandissement) qui servira d'identificateur et sur lequel les calculs de conversion seront basés. Utiliser les signaux en bas de 3,0 ppm serait aussi possible, mais les chances de superposition sont hautes en présence d'un mélange comme la térébenthine et des problèmes de résolution des signaux sont fortement envisagés. Les spectres RMN ¹H des autres molécules sont présentés à la figure 1.9 :

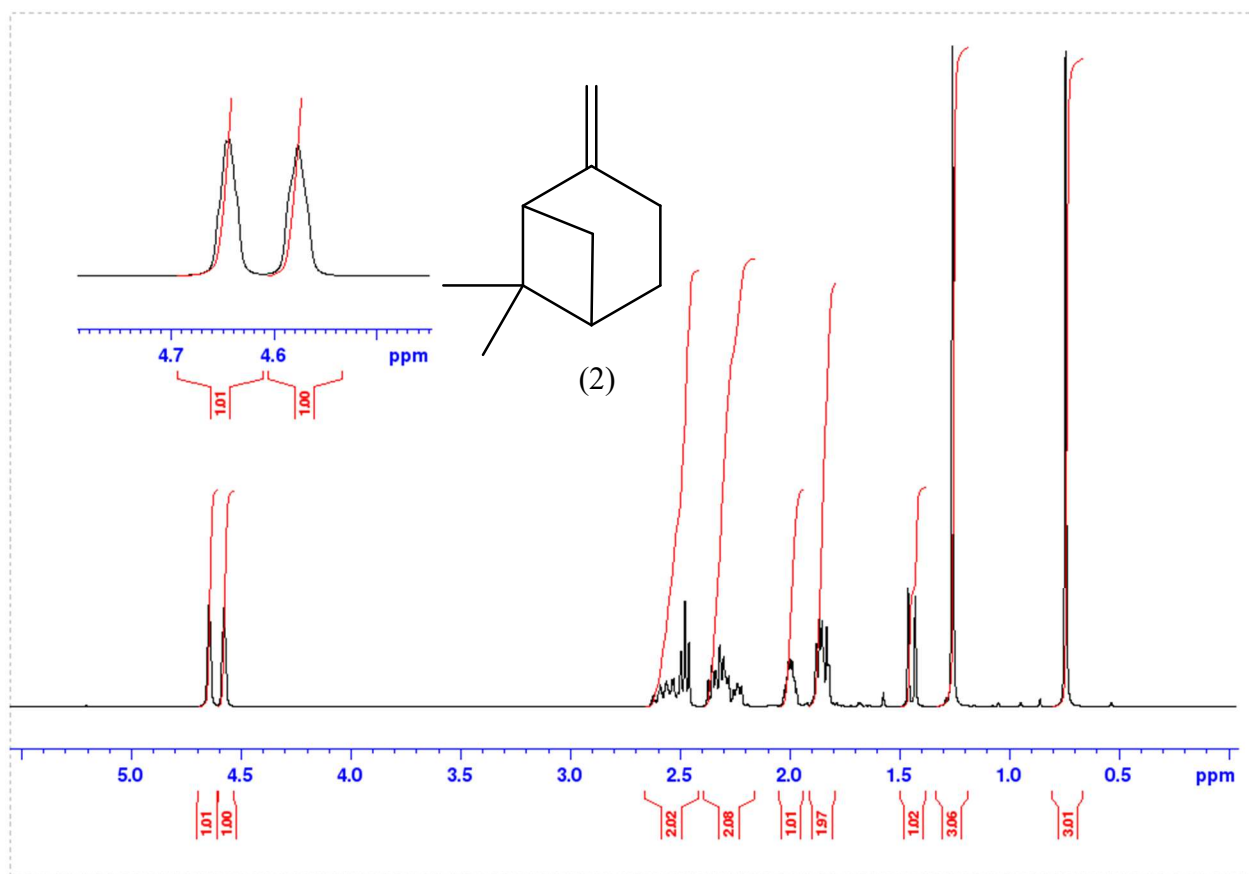


Figure 1.9 Spectre RMN ¹H du (-)- β -pinène (2)

Dans le cas du β -pinène (2), ce sont les signaux à 4,64 et 4,58 ppm qui sont les signaux caractéristiques. Contrairement au α -pinène (1), le β -pinène (2) a une double liaison à l'extérieur du cycle. Les protons du CH_2 terminal ne sont pas équivalents et se présentent séparément sur le spectre. Le spectre du camphène (3) est présenté à la figure 1.10 :

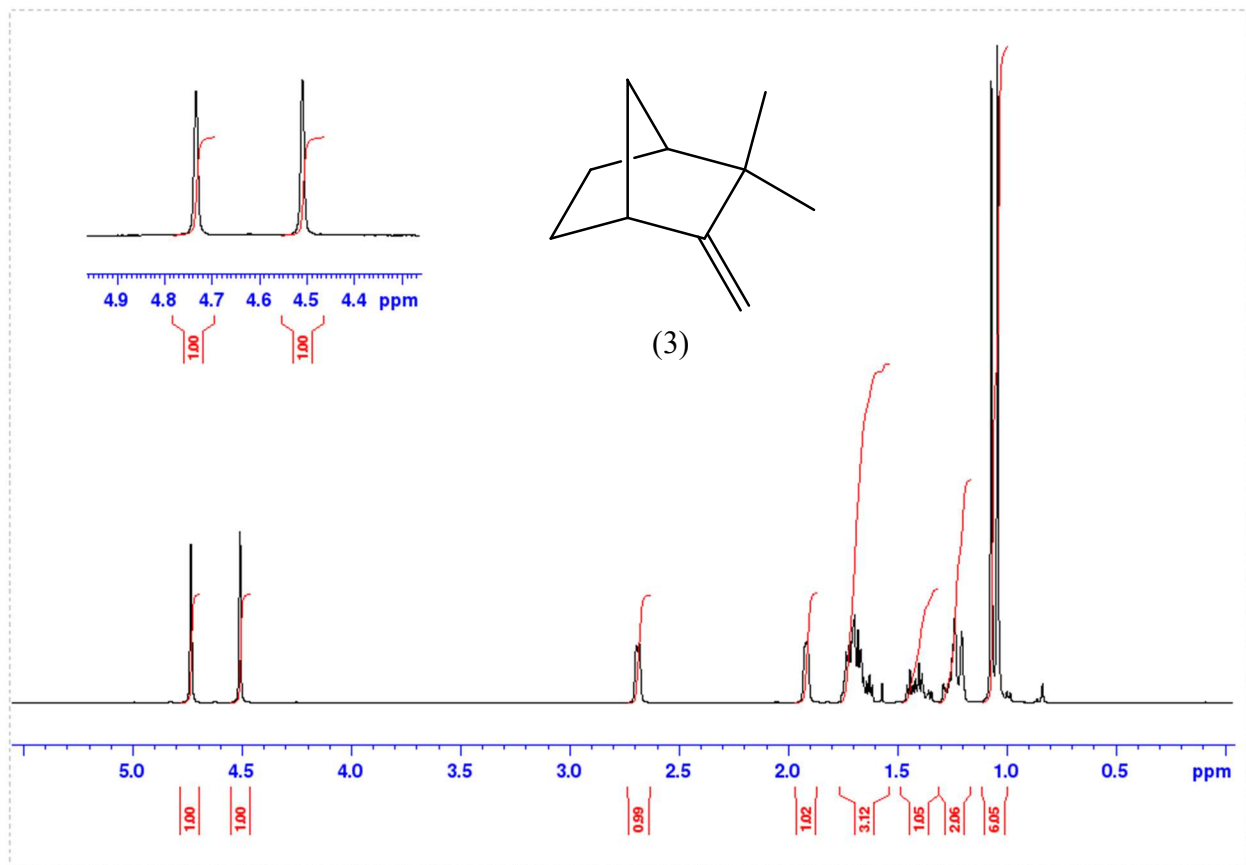


Figure 1.10 Spectre RMN ^1H du camphène (3) racémique

Le spectre RMN du camphène (3), à la figure 1.10 ci-haut, présente deux signaux caractéristiques à 4,73 et 4,51 ppm intégrant pour 1 proton chacun. Ce signal est, de manière similaire au β -pinène (2), le résultat d'une double liaison hors-cycle et représente un CH_2 terminal. C'est ce signal qui sera utilisé pour identifier la camphène (3) lors des suivis de réaction autant pour la réaction dont il est le produit que lorsqu'il est utilisé comme réactif.

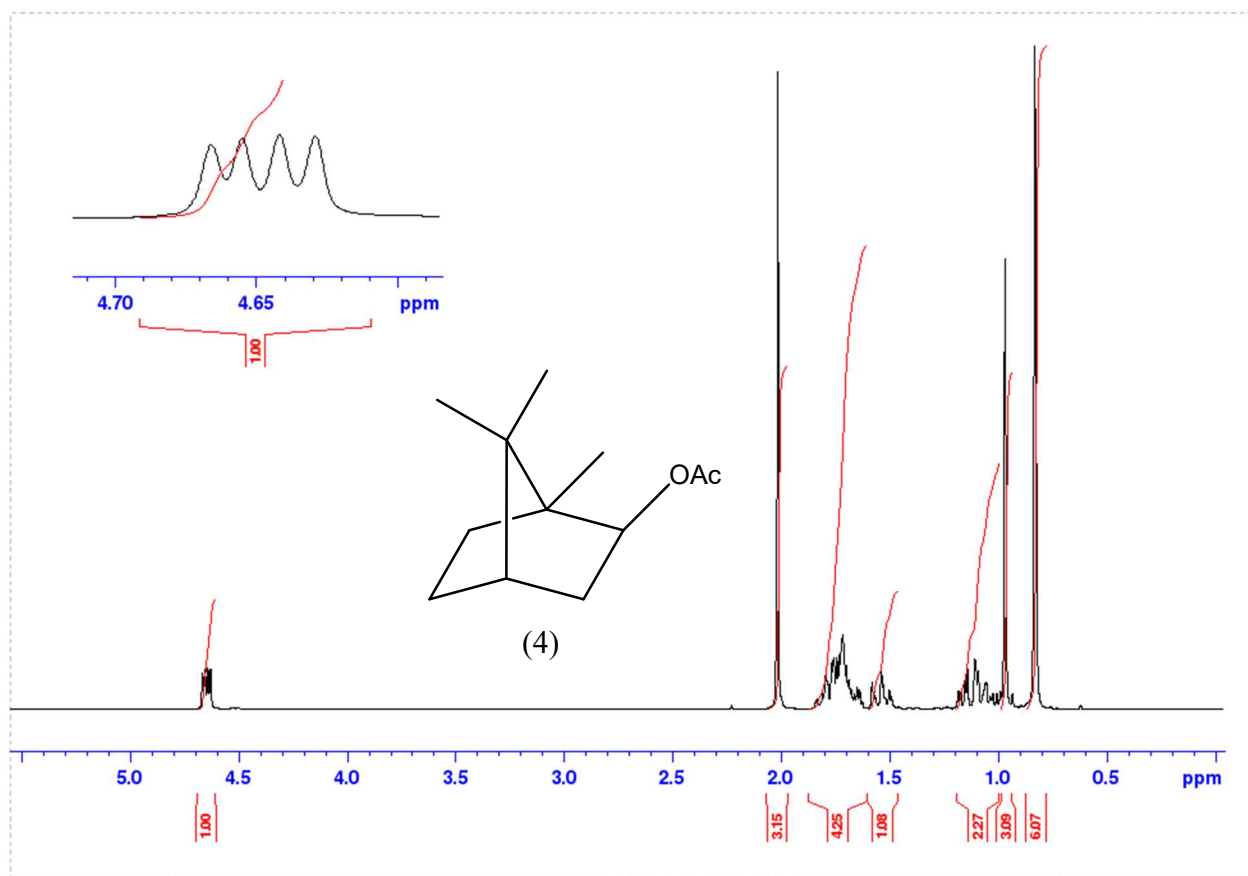


Figure 1.11 Spectre RMN ¹H de l'acétate d'isobornyle (4) racémique

L'acétate d'isobornyle (4) présenté à la figure 1.11, comporte quatre groupements CH₃, trois groupements CH₂ et deux groupements CH pour un total de 20 protons. Le signal caractéristique est le doublet de doublet à 4,65 ppm représentant le proton sur le carbone chiral qui lui est porteur de la fonction ester. Compte tenu de la position de ce proton, il ne peut que coupler avec les deux protons du CH₂ adjacent, donnant naissance à ce doublet de doublets. C'est ce signal qui sera utilisé comme référence lors des calculs de conversion.

La dernière molécule, l'acétate de bornyle (5), génère le spectre RMN ^1H présenté à la figure 1.12 :

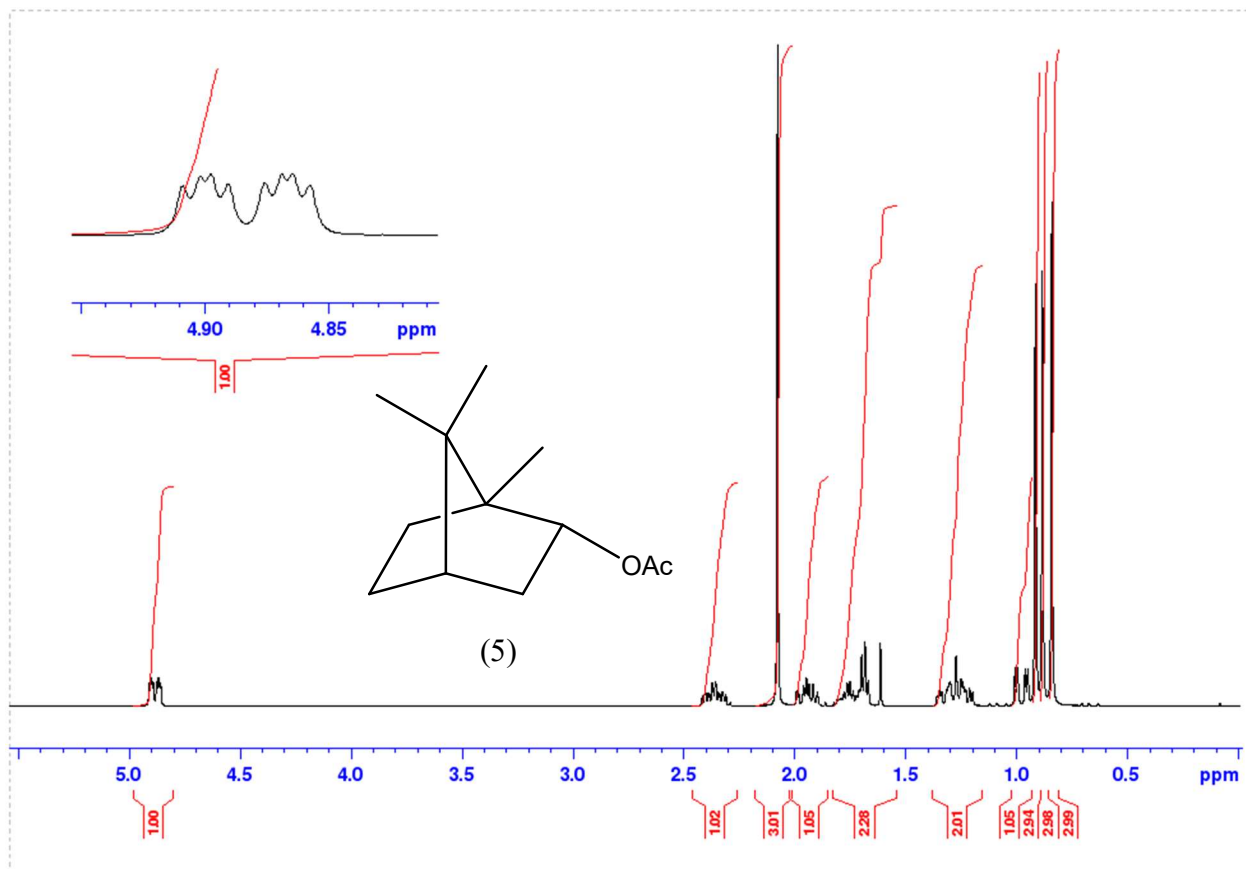


Figure 1.12 Spectre RMN ^1H du (-)-acétate de bornyle (5)

Les intégrations totalisent toujours 20 protons de manière identique à l'acétate d'isobornyle (4). Cependant, le signal caractéristique est très différent, se présentant comme un doublet de quadruplets à 4,88 ppm sur cet appareil. L'intégration de 1 indique qu'il s'agit toujours du proton sur le carbone chiral portant le groupement ester comme pour l'acétate d'isobornyle (4). Cette variation de multiplicité est notable et permet de différencier ces deux molécules, bien qu'elles soient des diastéréoisomères et que seule l'orientation des groupements change. La multiplicité d'un doublet de multiplet suggère que le proton couple avec le groupement méthyle sur le carbone chiral adjacent, donnant un multiplet qui sera dédoublé par un couplage avec un autre proton.

Une fois tous ces spectres acquis, une superposition des spectres, avec un agrandissement de la région des signaux caractéristiques a été réalisée à la figure 1.13:

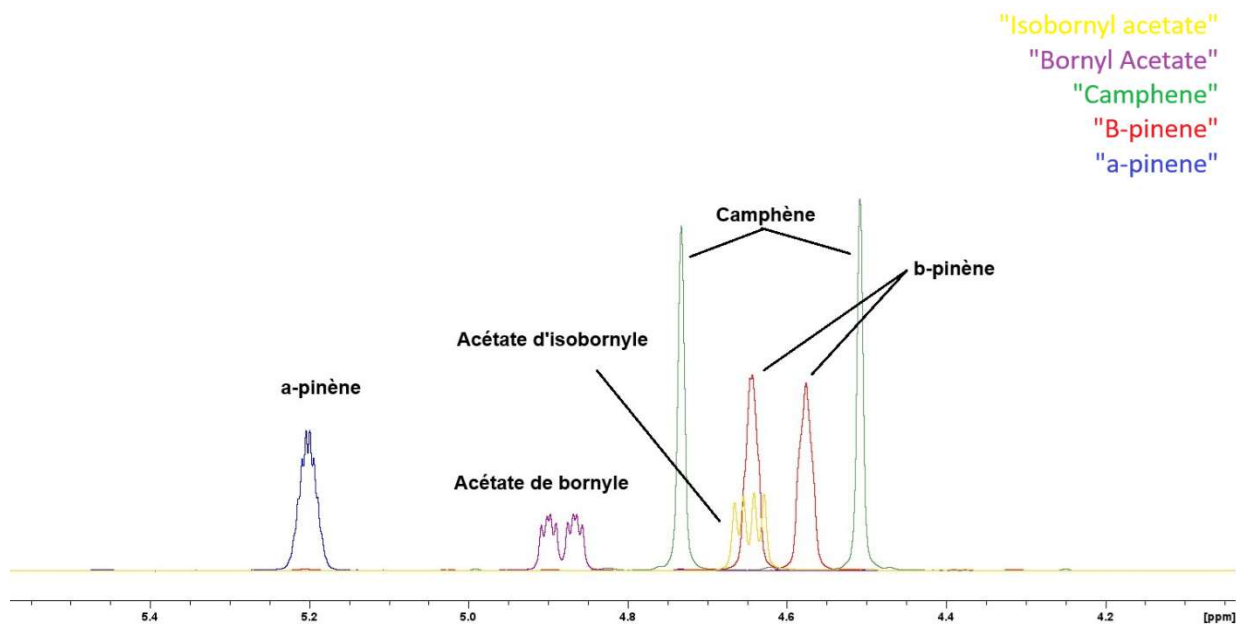


Figure 1.13 Superposition des agrandissements des spectres ^1H des molécules étudiées

La superposition démontre bien qu'il est possible d'identifier les multiples molécules étudiées par la RMN ^1H seulement. Le seul chevauchement observé survient entre le β -pinène (2) et l'acétate d'isobornyle (4). Si un mélange contenant ces deux composés était obtenu, il serait possible de quantifier en intégrant le signal du β -pinène (2) totalisant les deux produits à 4,64 ppm et celui à 4,58 ppm. En soustrayant la valeur du signal à 4,58 ppm de celle du signal à 4,64 ppm, la valeur associée à l'acétate d'isobornyle (4) serait obtenue.

Afin de bien synthétiser les informations extraites des spectres RMN ^1H , les données sont compilées au tableau 1.3 :

Produit	RMN ^1H		Multiplicité
	δ chimique (ppm)	Nbre de protons	
α -pinène (1)	5,20	1	Multiplet
β -pinène (2)	4,57/4,64	1/1	Singulet/singulet
Camphène (3)	4,73/4,51	1/1	Singulet/singulet
Acétate d'isobornyle (4)	4,65	1	Doublet de doublets
Acétate de bornyle (5)	4,88	1	Doublet de multiplet

Tableau 1.3 Signaux caractéristiques des molécules étudiées

Ce sont ces signaux qui seront recherchés lors des suivis réactionnels. Par comparaison, la superposition des mêmes spectres ^1H avec un agrandissement dans la zone de 0 à 3 ppm résulte en un spectre composé complexe comme le démontre la figure 1.14 suivante :

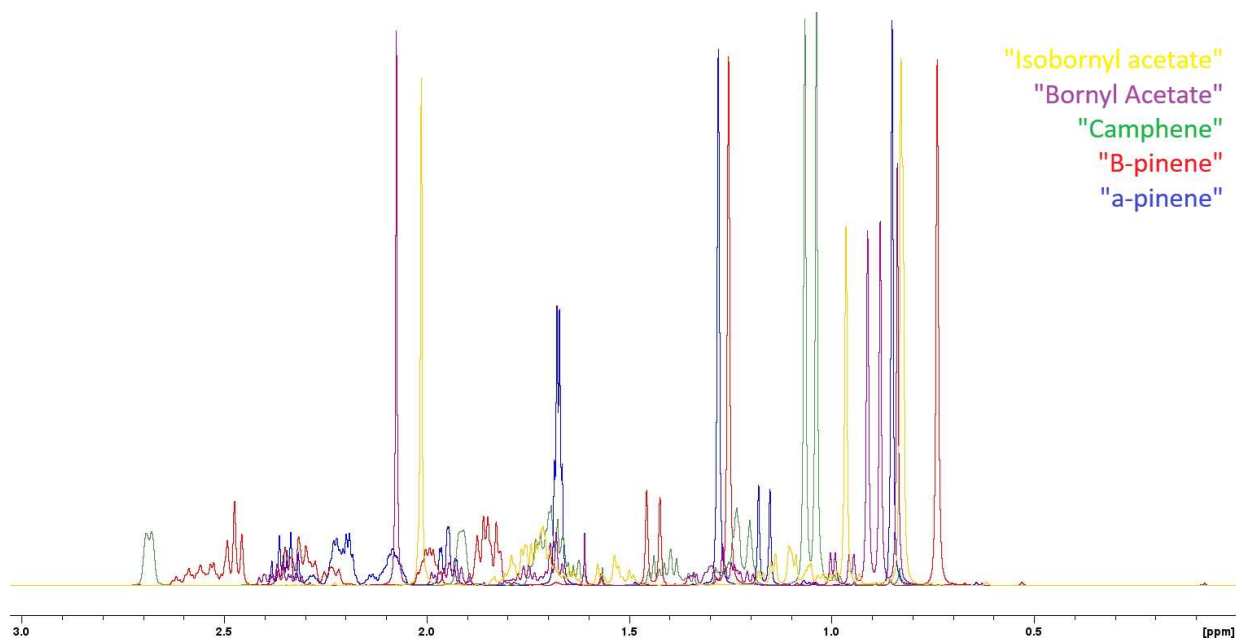


Figure 1.14 Superposition de la région de 0 à 3 ppm des spectres RMN ^1H des molécules étudiées

Il aurait été possible, à la suite d'un travail méticuleux, de départager les signaux afin de pouvoir calculer les conversions en court de réaction. Cependant, les signaux caractéristiques présentés précédemment fournissent une interprétation beaucoup plus simple.

La spectroscopie RMN ^{13}C pourrait être utilisée afin d'identifier les molécules présentes, mais l'acquisition de ces spectres est beaucoup plus longue dû à la faible abondance isotopique du carbone 13. Cette analyse pourra être utile à la fin du procédé pour contre-vérifier l'identité d'une molécule si des doutes subsistaient.

La spectroscopie RMN ^1H permet d'identifier et de quantifier rapidement des molécules organiques avec une incertitude d'environ $\pm 1\%$. Comme mentionné précédemment, elle ne permet toutefois pas de séparer les énantiomères, dénotés par les signes « + » et « - ». C'est avec la chromatographie en phase gazeuse que la quantification des énantiomères sera obtenue.

1.1.4 Chromatographie chirale en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse avec détection par induction de flamme (GC-FID) permet de séparer des produits selon leur affinité avec la phase stationnaire à l'intérieur d'une colonne. Cette affinité aura pour effet de retenir temporairement les molécules et de retarder leur arrivée au détecteur, où elles seront quantifiées. Ce retard est appelé le « temps de rétention » et c'est par cette propriété que les molécules sont séparées. Dans le cas d'un détecteur par induction de flamme (FID), le signal ne peut être combiné à une banque de donnée afin d'obtenir l'identification directe des molécules comme ce serait le cas avec un détecteur spectroscopique de masse (MS). Il faudra donc injecter chaque produit pur commercial séparément et noter le temps de rétention obtenu. Dans une colonne classique tapissée de polysiloxanes à l'intérieur, les énantiomères ne seraient pas séparés puisque les interactions avec la garniture de la colonne serait la même peu importe l'orientation des groupements d'une molécule. Le développement de colonnes chirales par les fabricants a donc été une priorité depuis la commercialisation de la méthode analytique, spécialement pour les produits pharmaceutiques puisque un énantiomère d'une molécule peut avoir un effet bénéfique, tandis que l'autre peut avoir un effet nul ou néfaste.^{30 31} La colonne choisie est la colonne Cyclosil-β d'Agilent Technologies.³² Cette colonne chirale d'une longueur de 30 mètres, avec un film de 0,25 μm, et un diamètre interne de 0,25 mm a été achetée et utilisée pour l'entièreté du présent projet. Les analyses ont été réalisées sur un appareil Hewlett Packard G1530A comme mentionné à l'entrée 4 de l'annexe A. La préparation de l'échantillon est simple et a été appliquée à tous les analytes étudiés. Une masse d'environ 20 mg de produit ont été dissouts dans 10 mL d'heptane grade HPLC Fisher Chemicals. À la suite d'une agitation afin de dissoudre complètement le produit, une filtration sur un filtre en PTFE de porosité 0,45 μm a été réalisée afin d'éviter d'injecter des particules solides qui pourraient boucher la colonne. Les conditions d'analyse ont été déterminées selon une étude fournie par le fabricant de la colonne³³ ainsi qu'à partir de leurs précieux conseils lors d'une discussion avec leur expert. Les conditions sont présentées au tableau 1.4 :

Instrument	HP 6890 series	Phase mobile	Hydrogène
Colonne	Cyclosil-B (Agilent)	Volume d'injection	1 μL
Longueur de la colonne	30 m	« Split »	150 : 1
Diamètre de la colonne	0,250 mm	Débit	1,5 mL/min
Épaisseur du film	0,25 μm	Température d'injection	200 °C

Tableau 1.4 Conditions d'analyse de la chromatographie en phase gazeuse

En plus de ces conditions, le programme de température, présenté ci-dessous à la figure 1.15, est central pour une bonne séparation :

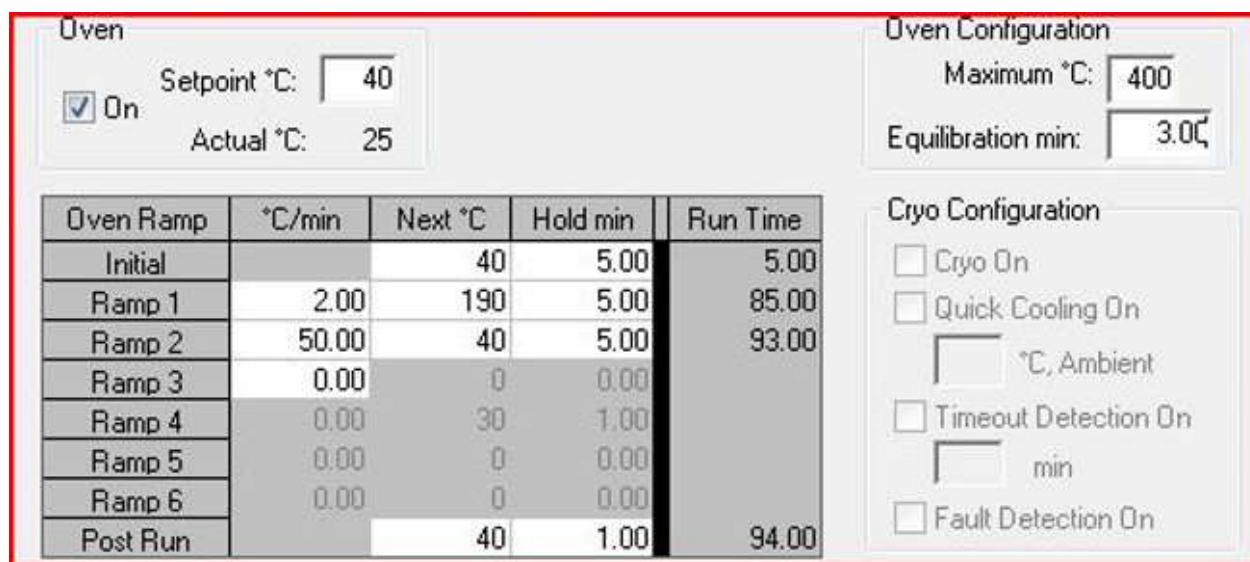


Figure 1.15 Programme de température du four du chromatographe

Après l'injection, la colonne, préchauffée à 40°C et maintenue pendant 5 minutes, est lentement augmentée en température, à raison de 2 °C/min. Lorsqu'une température de 190 °C est obtenue, celle-ci est maintenue pour une durée de 5 minutes afin que les analytes puissent migrer hors de la colonne pour éviter toute contamination dans les analyses subséquentes. L'habitacle est ensuite rapidement refroidi jusqu'à 40°C en prévision de la prochaine analyse.

Comme mentionné au tableau 1.1, chaque énantiomère possède un numéro identificateur CAS unique et a été acheté énantiomèrement enrichi ou pur lorsque possible. Chaque molécule devra donc être analysée séparément par GC-FID afin d'obtenir le temps de rétention propre à chaque énantiomère. Dans le cas où l'un des énantiomères ne serait pas disponible, mais que son mélange racémique l'est, il sera possible de déduire le temps de rétention de l'énantiomère manquant puisque le mélange racémique présentera deux signaux si la séparation est efficace.

Dans le cas du α -pinène (1), les énantiomères ont été obtenus séparément. De plus, le mélange racémique était aussi disponible, ce qui a simplifié les travaux. Le chromatogramme du (+)- α -pinène (1) est présenté à la figure 1.16 :

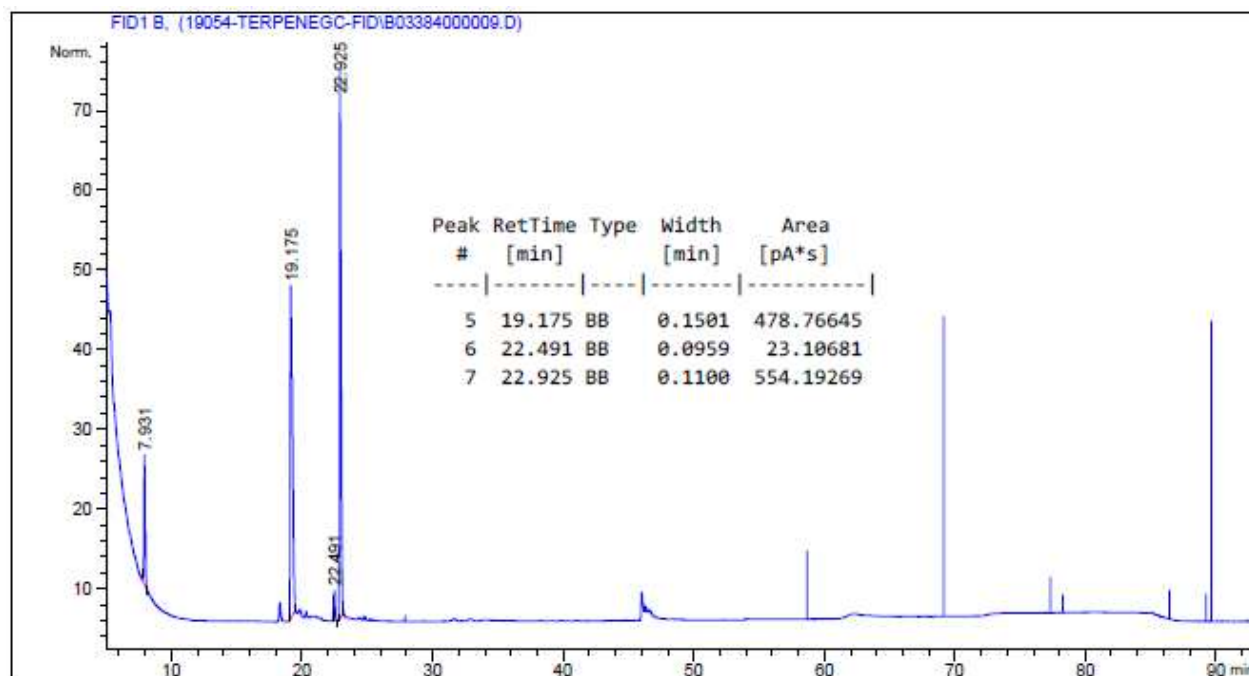


Figure 1.16 Chromatogramme du (+)- α -pinène (1) énantiomère enrichi

Ce chromatogramme comprend plusieurs signaux. Premièrement, un signal majeur est présent sous la barre des 10 minutes. Ce signal est associé à l’heptane HPLC utilisé et est communément appelé « front de solvant ». Tous les signaux dans le front de solvant sont non conséquents pour nos besoins puisqu’il s’agit des composés très volatiles provenant du solvant et de ses impuretés. Ensuite, les raies au-dessus de 50 minutes ne sont pas de réels signaux, mais des artéfacts produits par le détecteur FID. Il est possible qu’à ce moment, la bonbonne de gaz utilisée était presque vide, ce qui peut générer ce type de raies. Finalement, les signaux à 22,925 min, 22,491 min et 19,175 min sont à prioriser. Selon les certificats d’analyse fournis, la pureté est de 98 % minimalement. De plus, l’excès énantiomérique doit être de plus de 85 % afin de rencontrer les spécifications du fabricant. À ce stade, on peut conclure que le signal à 22,925 min est le (+)- α -pinène (1) puisqu’il est largement majoritaire et que le (-)- α -pinène (1) peut être soit le signal à 19,175 min ou à 22,491 min. L’analyse du (-)- α -pinène (1) énantiomère pur donnera davantage d’informations et pourra déterminer le signal à retenir.

Ensuite, le chromatogramme du (-)- α -pinène (1) a été acquis à la figure 1.17:

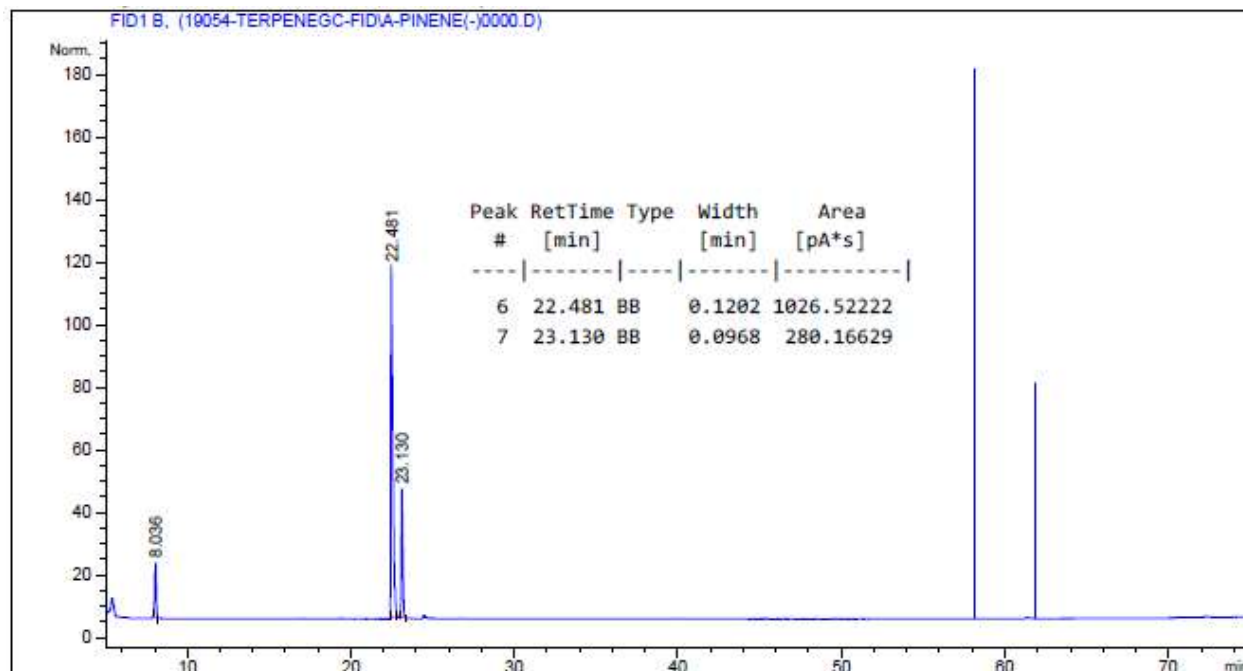


Figure 1.17 Chromatogramme du (-)- α -pinène (1) énantiomériquement enrichi

Celui-ci présente deux signaux intéressants. Premièrement, le signal à 22,481 min est majoritaire et est associé à l'énantiomère (-) du α -pinène (1). En se référant au précédent chromatogramme du (+)- α -pinène (1), on peut donc conclure que le signal associé au (-)- α -pinène (1) était donc celui à 22,491 min. Le signal à 23,130 min correspond à l'énantiomère (+) comme déterminé précédemment. Les aires seront utilisées plus loin dans l'analyse dans le but de quantifier les proportions de chaque énantiomère dans les échantillons analysés. Afin de confirmer les informations extraites des chromatogrammes, le mélange racémique, théoriquement composé de 50 % de chaque énantiomère, a été analysé selon la même méthode et est présenté à la figure 1.18:

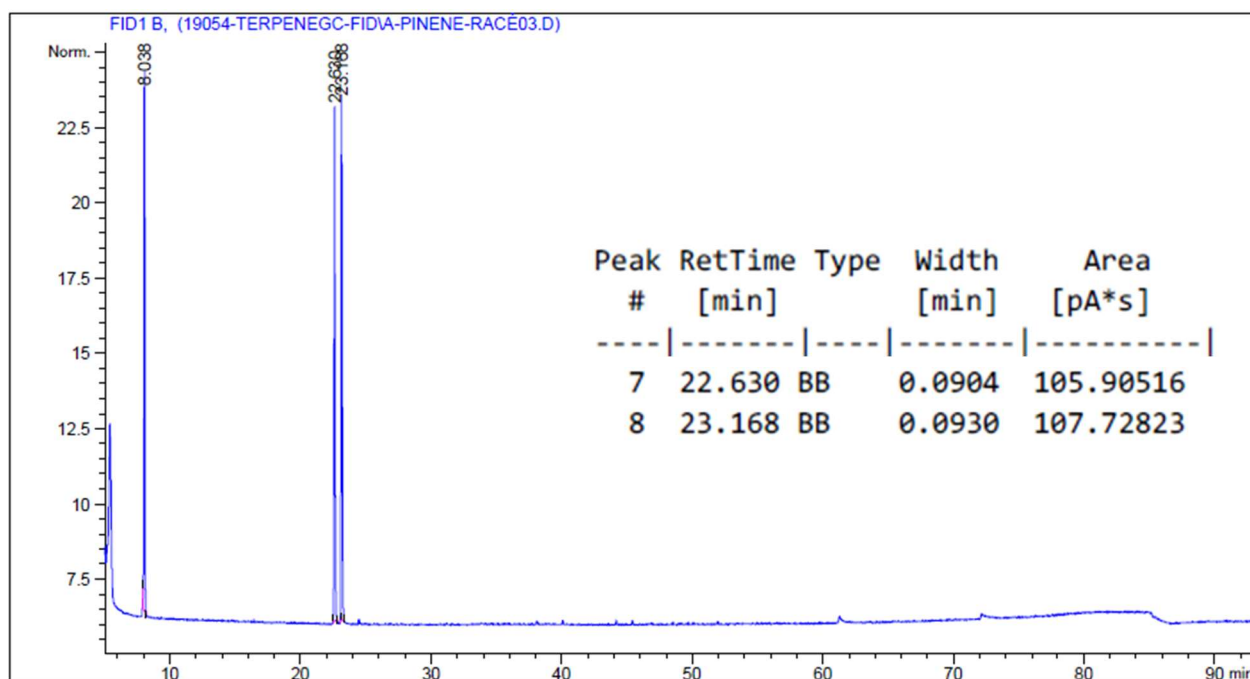


Figure 1.18 Chromatogramme du α -pinène (1) racémique

Le mélange racémique présente deux signaux distincts et intégrables. Les signaux à 22,630 min et 23,168 min composent 49,57 % et 50,43 % de l'échantillon respectivement. Ces données confirment que les énantiomères (+) et (-) du α -pinène (1) sont bien séparés par la méthode en place.

Dans le cas du β -pinène (2), seul l'énantiomère (-) était disponible et son chromatogramme est présenté à la figure 1.19 :

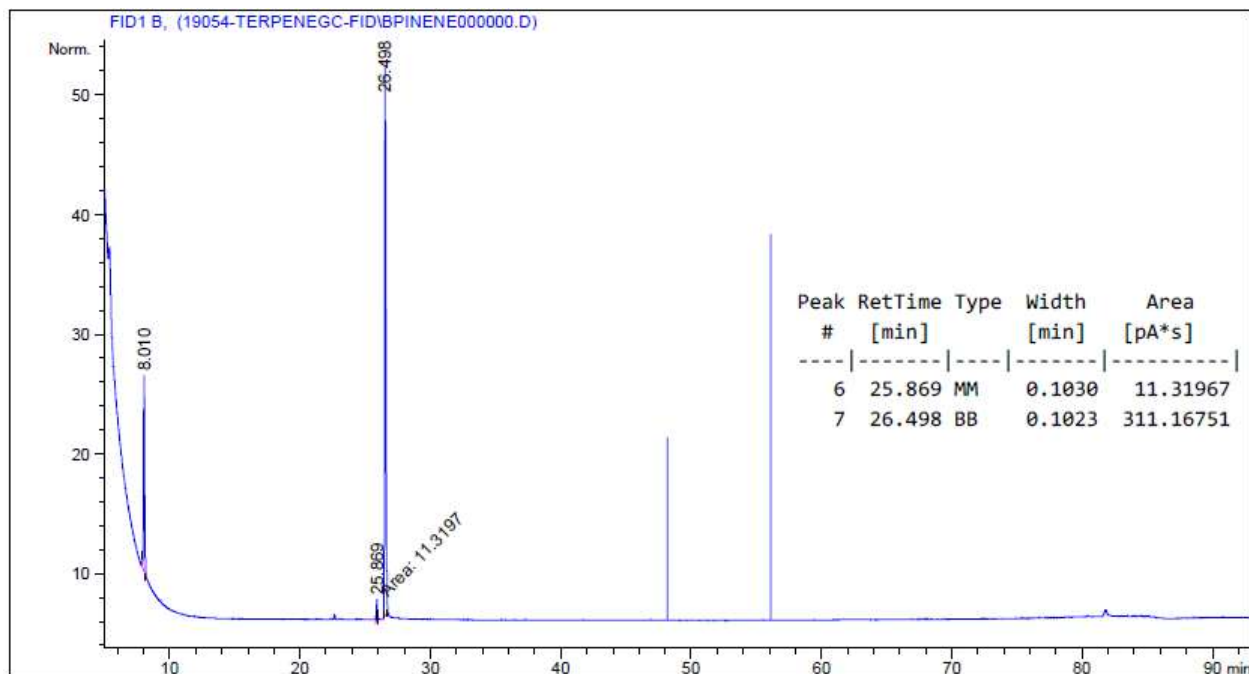


Figure 1.19 Chromatogramme du (-)- β -pinène (2)

Le signal majoritaire est situé à 26,498 min et correspond sans aucun doute à l'énantiomère (-) du β -pinène (2). Le signal à 25,869 min devrait logiquement appartenir à l'énantiomère (+), mais il est impossible de le confirmer puisque ni le produit pur, ni le mélange racémique n'ont été obtenus.

La même méthode d'analyse par chromatographie chirale en phase gazeuse a été appliquée au camphène (3) et le chromatogramme en résultant est présenté à la figure 1.20:

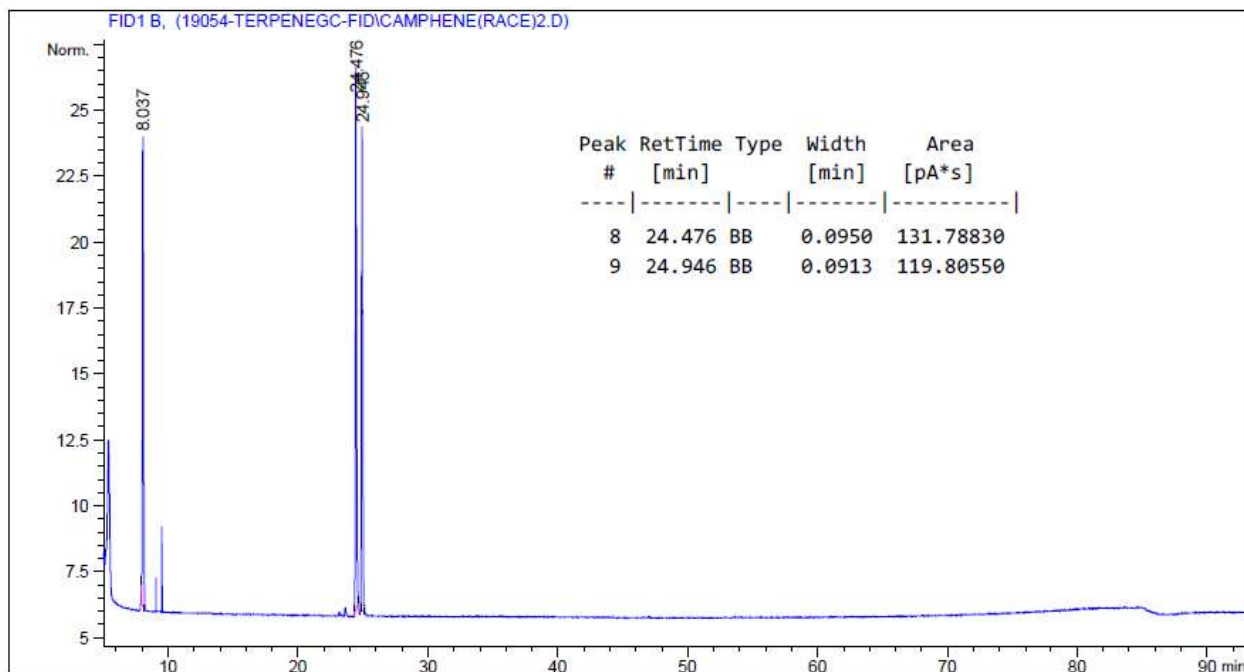


Figure 1.20 Chromatogramme du camphène (3) racémique

Le chromatogramme montre deux signaux presque égaux en intensité et ce sont les énantiomères du camphène (3). En analysant le (+)-camphène (3) pur ou enrichi, il est possible d'identifier le signal correspondant à l'énantiomère (+) comme à la figure 1.21 :

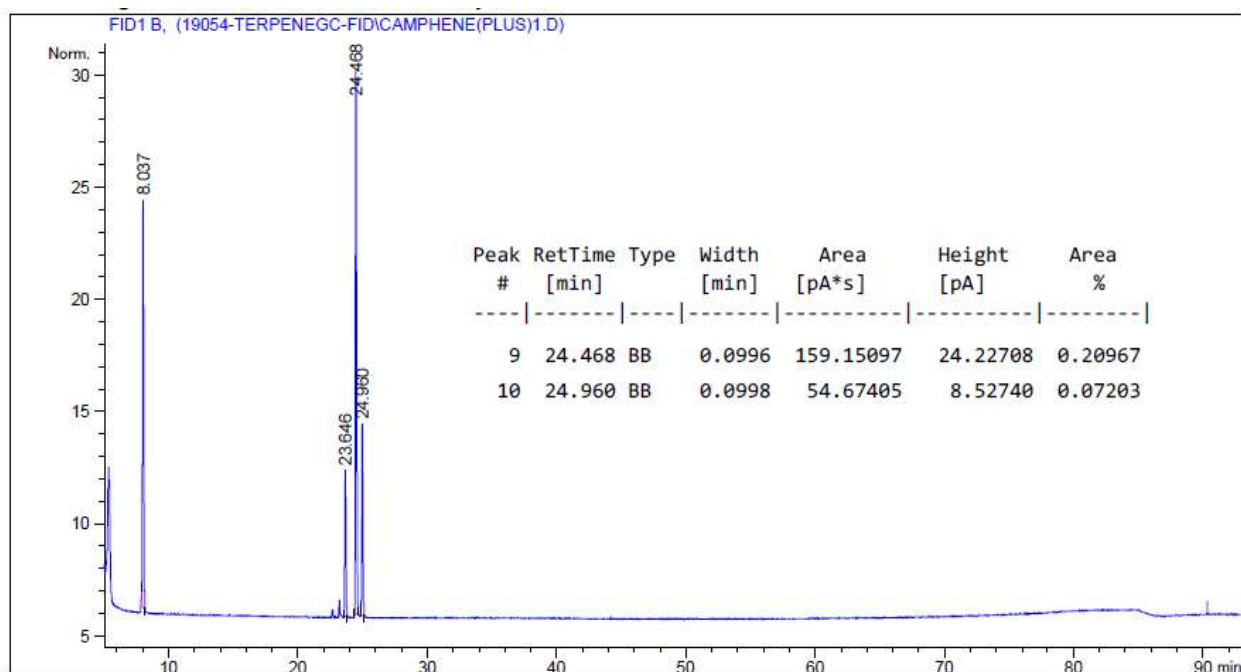


Figure 1.21 Chromatogramme du (+)-camphène (3)

Cette analyse permet d'assigner le (+)-camphène (3) au signal à 24,468 minutes. Selon le chromatogramme du mélange racémique présenté précédemment, l'énantiomère (-) est identifiable par le signal à 24,960 minutes.

Quant à l'acétate d'isobornyle (4), la méthode actuelle ne permettait pas de séparer les énantiomères. Un mélange racémique injecté ne présentait qu'un seul et unique signal (Annexe D, section 1.1.4), malgré les modifications tentées. Une rampe de température plus lente ou un plateau initial à 40 °C plus long sont des paramètres qui ont été changés, mais le résultat était toujours le même. Le même phénomène était aussi observé pour l'acétate de bornyle (5). Il était donc clair que les esters ne pouvaient être séparés par la colonne installée. Des recherches suggèrent que des colonnes adaptées existent³⁴, mais le prix prohibitif a éliminé cette option. La dernière possibilité consistait à dériver les esters afin de les rendre séparables. L'hydrolyse en alcool a été choisie et une méthode de la littérature a été appliquée³⁵. La procédure expérimentale est disponible à l'annexe A, entrée 13. Les spectres RMN ¹H des produits d'hydrolyse commerciaux, soit l'isobornéol (6) et le bornéol (7), sont disponibles à l'annexe C à la section 1.1.4.

Il est important d'avoir à l'esprit le mécanisme de l'hydrolyse d'un ester en milieu basique ³⁶ rappelé à la figure 1.22 :

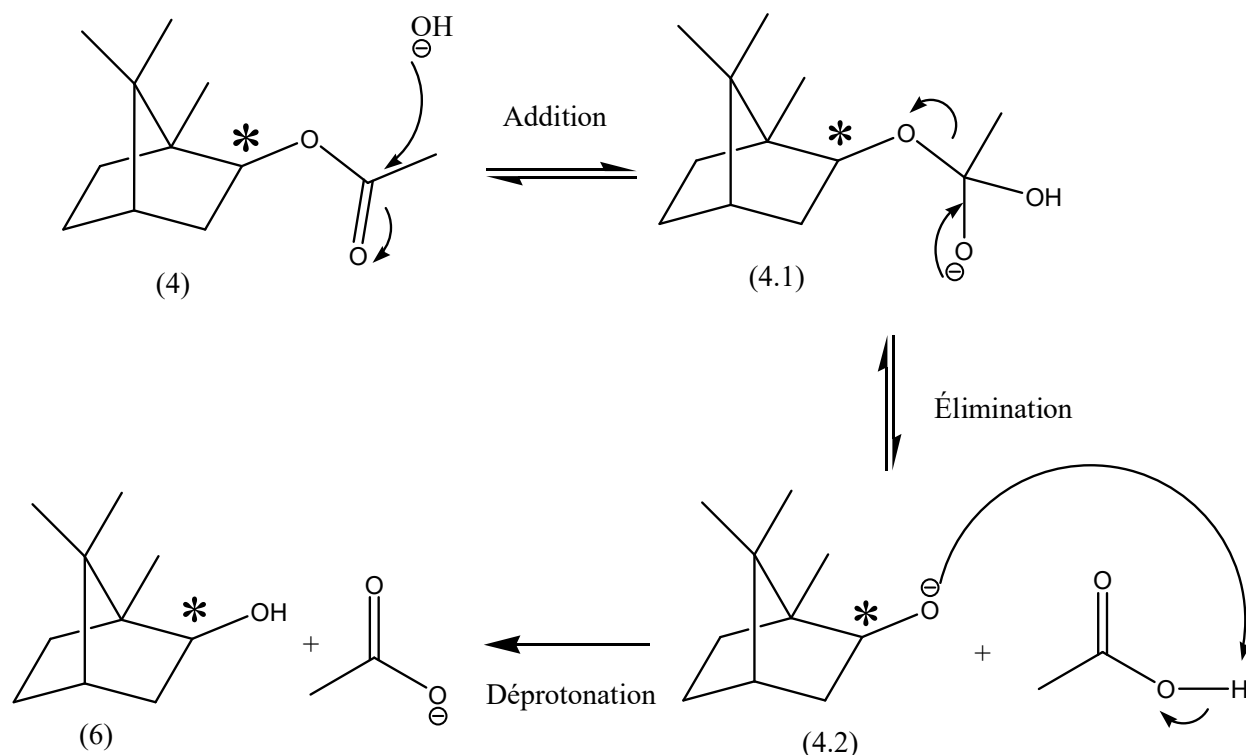


Figure 1.22 Mécanisme de l'hydrolyse de l'acétate d'isobornyle (4) en milieu basique

Comme le mécanisme le démontre, le carbone chiral le plus près de la fonction ester (dénotté par un astérisque) n'est pas impliqué dans la réaction et l'orientation du groupement fonctionnel (OH pour l'alcool ou COO pour l'ester) ne devrait pas être modifiée par l'hydrolyse. L'analyse RMN ^1H du produit, superposée au spectre de l'isbornéol (6) commercial (Annexe C, section 1.1.4), confirme cette hypothèse :

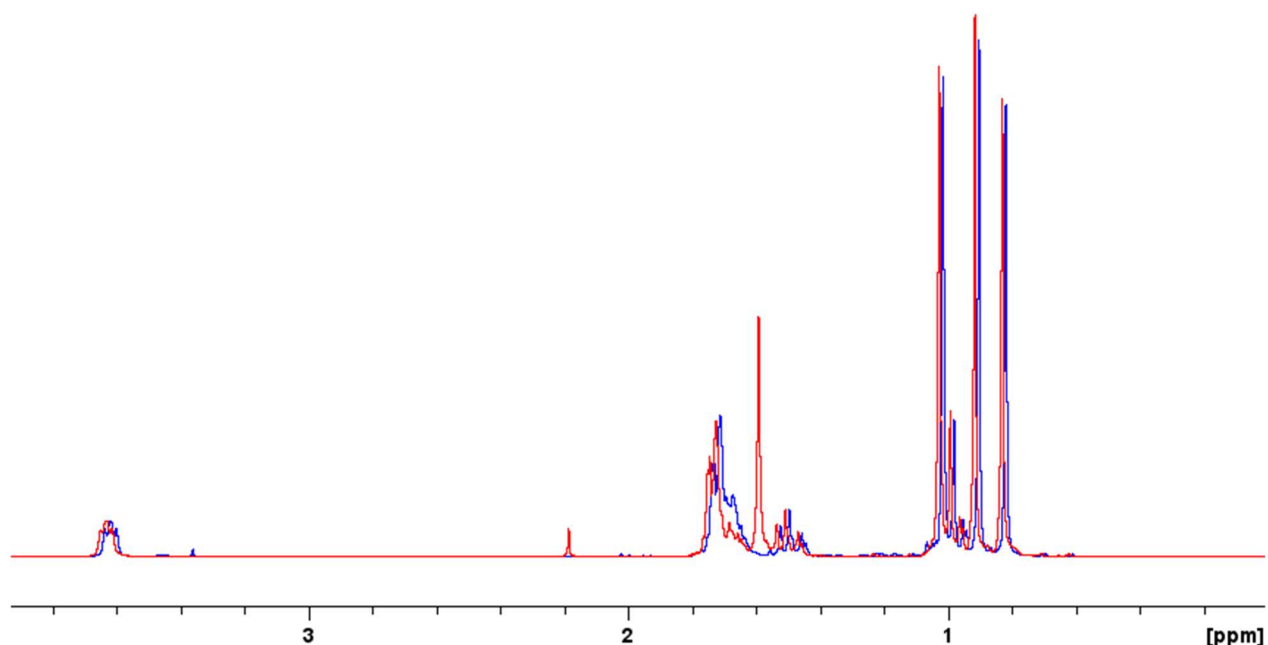


Figure 1.23 Superposition des spectres RMN ^1H de l'isobornéol (6) commercial (rouge) et du produit d'hydrolyse (bleu)

Outre le signal à 1,58 ppm associé à l'eau ou au proton alcool de l'isobornéol (6), les deux spectres de la figure 1.23 sont pratiquement identiques. Si l'orientation avait changé, le spectre du bornéol (7) (annexe C, section 1.1.4), dont les signaux sont radicalement différents, aurait été observé. L'analyse complète du spectre RMN de l'isobornéol (6) est disponible à l'annexe A, entrée 13.

L'analyse GC-FID de ce produit de synthèse purifié révèle une avancée dans la séparation des énantiomères comme démontré à la figure 1.24 :

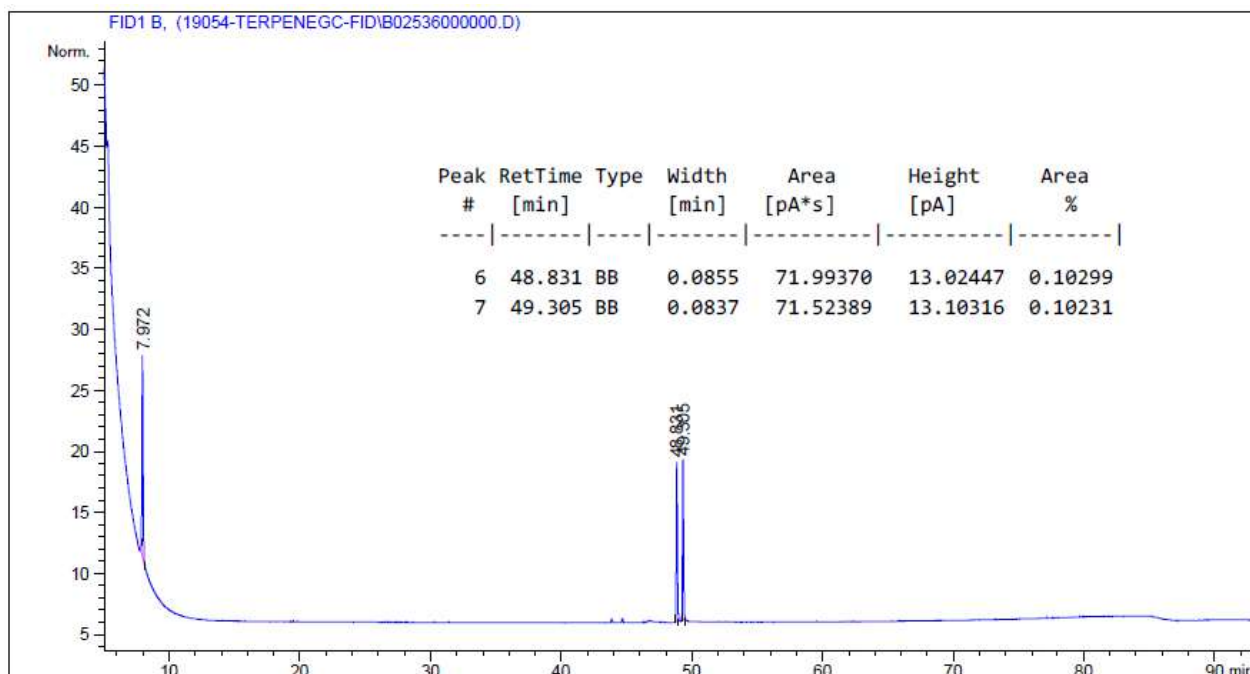


Figure 1.24 Chromatogramme du produit d'hydrolyse de l'acétate d'isobornyle (4) racémique

La dérivation en alcool de l'acétate d'isobornyle (4) racémique commercial présente maintenant deux signaux en GC-FID chirale. Les intensités des signaux sont pratiquement identiques, ce qui signifie qu'il s'agit bien d'un produit racémique. Le mélange est composé de parts égales de (+)-isobornéol (6) et (-)-isobornéol (6). Cependant, acquérir ces produits énantiomèrement enrichis s'avérait extrêmement difficile. Bien que documentée, leur synthèse demande des expertises qui surpassent les objectifs du projet de recherche.³⁷ Il a donc été décidé de se contenter des résultats actuels. Il sera impossible d'associer les correspondances entre les signaux et les énantiomères de l'isobornéol (6). De plus, une autre incertitude demeure. Quel énantiomère de l'isobornéol (6) est obtenu lors de l'hydrolyse des énantiomères de l'acétate d'isobornyle (4) ? Bien que le carbone chiral ne soit pas affecté, il est impossible de prédire l'effet du changement de fonction chimique sur le résultat de polarimétrie. Pour déterminer ces relations, il faudrait pouvoir synthétiser un acétate d'isobornyle (4) énantiomèrement enrichi ou pouvoir sourcer les énantiomères purs. Les résultats des synthèses aux sections 2.2 et 2.4 indiqueront s'il est nécessaire ou non de réaliser ces études plus poussées.

Quant à l'acétate de bornyle (5), la même dérivation a été appliquée qu'à l'acétate d'isobornyle (4) et le produit d'hydrolyse a été analysé par RMN. Le spectre du proton est présenté à la figure 1.25 :

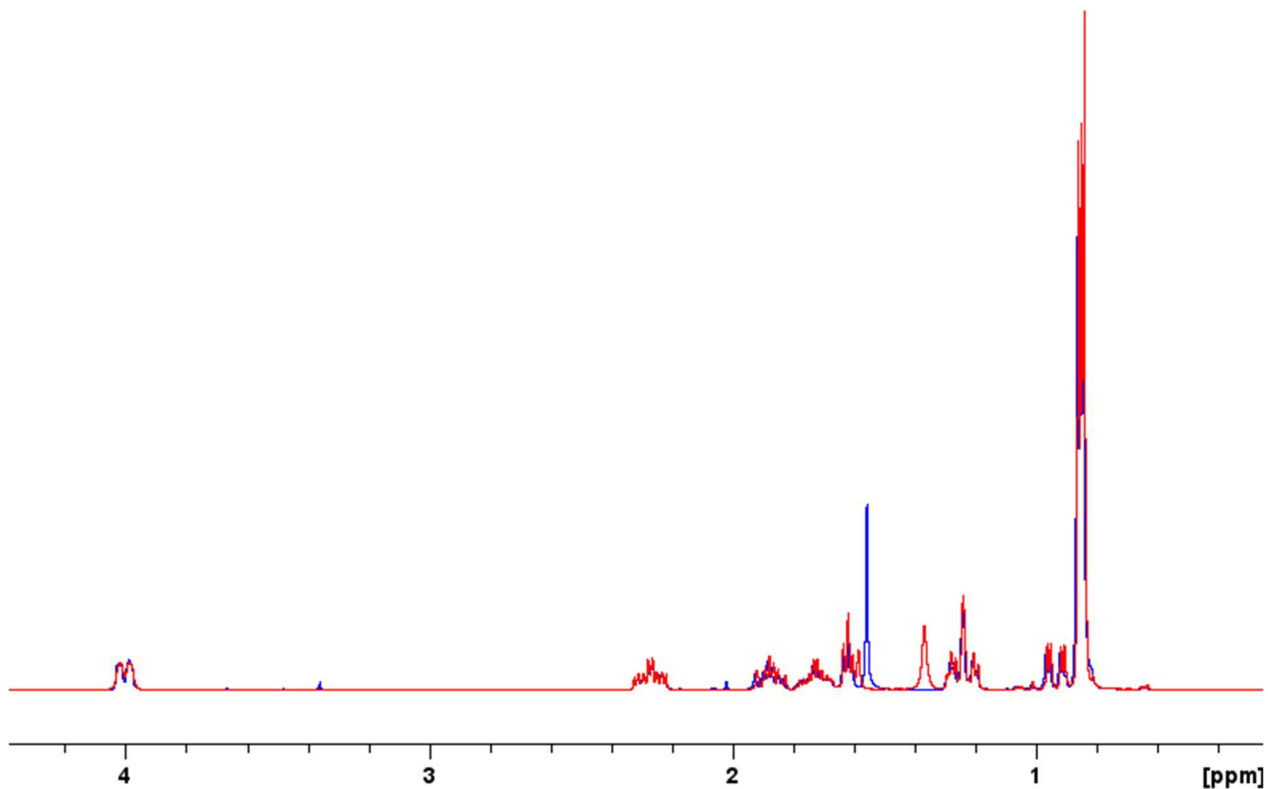


Figure 1.25 Superposition des spectres RMN ^1H : Hydrolyse de l'acétate de bornyle (5) (bleu) et bornéol (7) (rouge)

Tel qu'attendu selon le mécanisme, le produit d'hydrolyse du (-)-acétate de bornyle (5) est le bornéol (7). La superposition des spectres RMN ^1H du produit et du (+)-bornéol (7) commercial le confirme. Outre le signal à 1,57 ppm, probablement de l'eau ou le proton alcool, les deux spectres sont identiques. L'analyse complète du spectre du bornéol (7) est disponible à l'annexe A, entrée 13. Le spectre RMN du produit commercial peut être consulté à l'annexe C, entrée 1.1.4. L'analyse GC-FID chirale, à la figure 1.26, a aussi été obtenue :

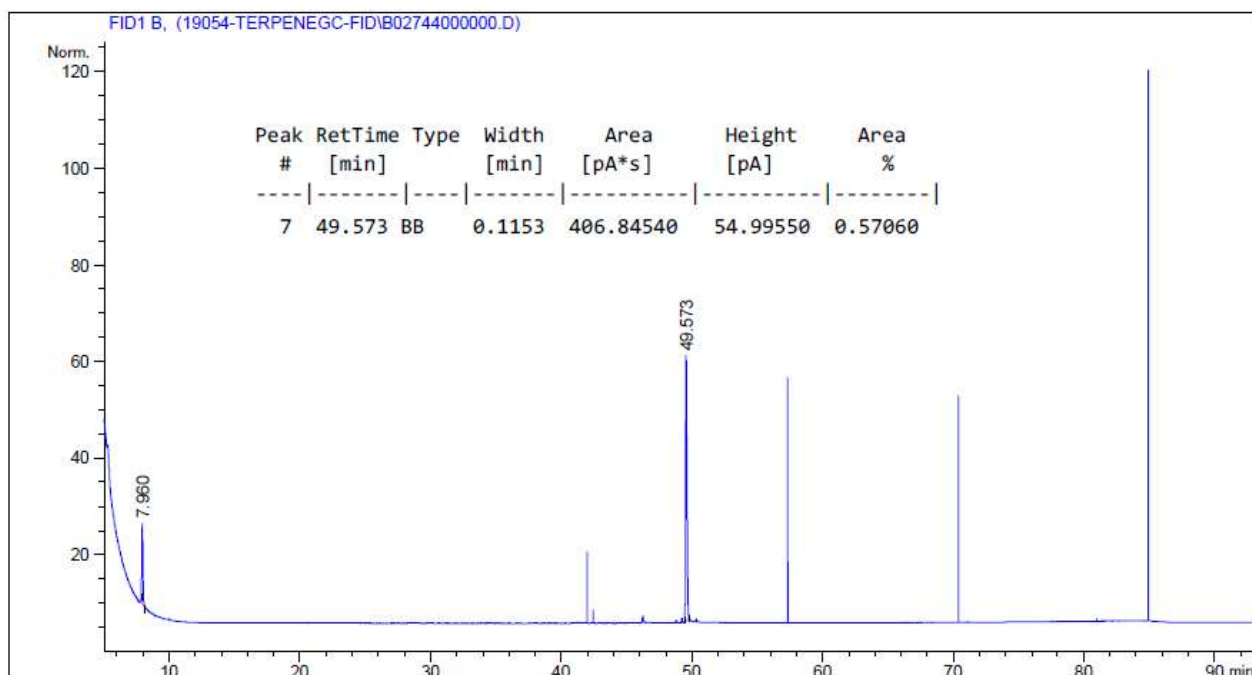


Figure 1.26 Chromatogramme du produit d'hydrolyse du (-)-acétate de bornyle (5)

Sur ce chromatogramme, un seul signal est observé. L'hydrolyse de l'acétate de bornyle (5) en bornéol (7) n'est donc pas une réaction racémisante. Si tel avait été le cas, deux signaux, d'intensités égales auraient été observés. Ceci ouvre la porte à compléter l'étude qui avait été impossible avec l'acétate d'isobornyle (4). En se procurant les énantiomères purs du bornéol (7), il est possible de l'estérifier en acétate de bornyle (5) énantiomèrement pur et donc combler le manque lors de l'approvisionnement initial. De plus, il sera possible de savoir quel énantiomère du bornéol (7) résulte de l'hydrolyse d'un énantiomère particulier de l'acétate de bornyle (5).

Pour se faire, les deux énantiomères du bornéol (7) ont été achetés chez les fournisseurs habituels (annexe A, entrée 1). Ceux-ci ont premièrement été analysés par RMN ^1H pour confirmer qu'il s'agissait bien des bons produits (Annexe C, section 1.1.4). Ensuite, ils ont été analysés par GC-FID chirale selon la méthode usuelle. Les temps de rétention sont de 50,310 min pour le (+)-bornéol (7) et de 49,588 min pour le (-)-bornéol (7). Les chromatogrammes sont disponibles à l'annexe D à la section 1.1.4. Les produits ont été estérifiés par une estérification de Fischer classique en milieu acide. La procédure expérimentale est disponible à l'annexe A, entrée 14.

Les spectres RMN ^1H du produit commercial et des produits d'estérification des bornéols sont pratiquement superposables comme visible à la figure 1.27 :

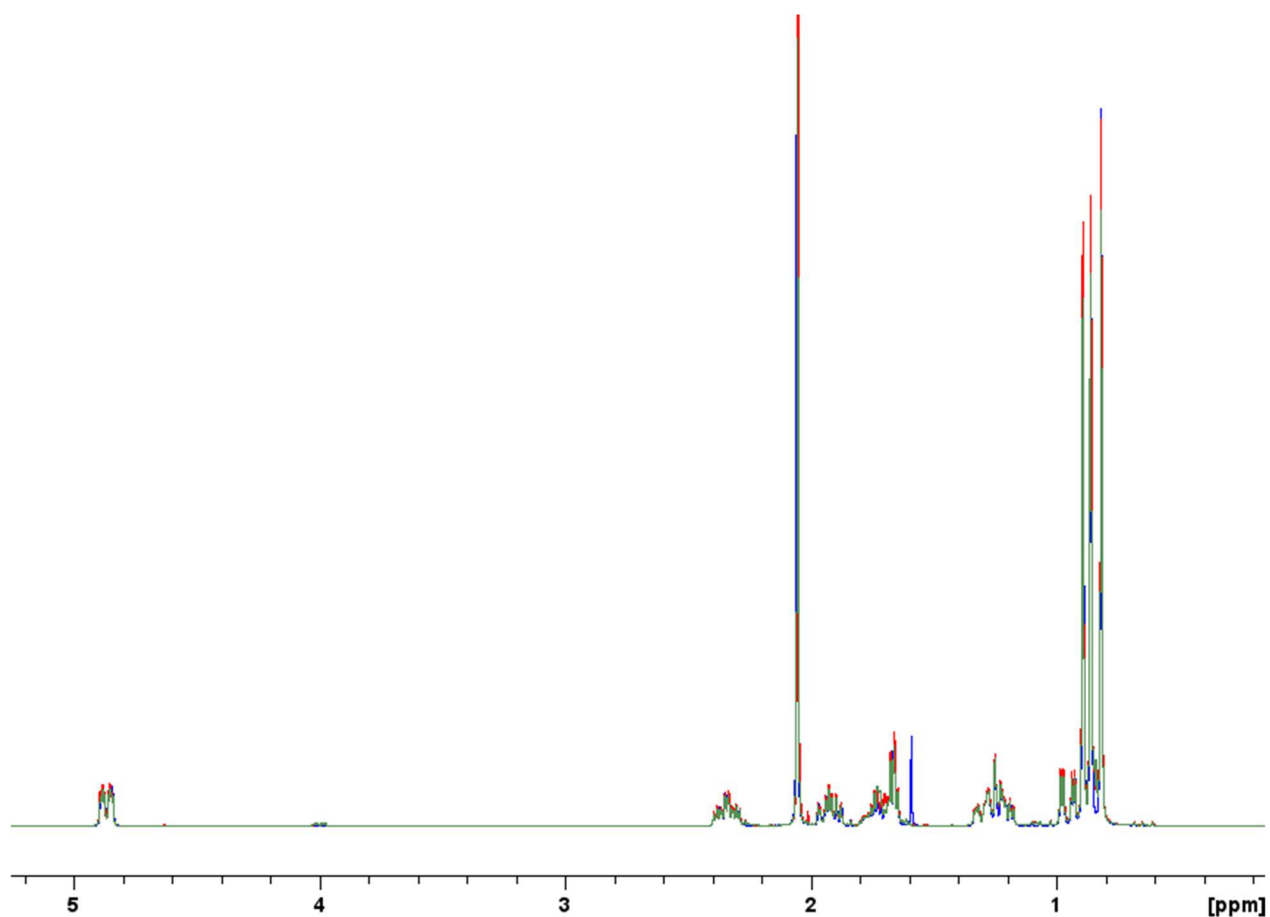


Figure 1.27 Superposition des spectres RMN ^1H de l'acétate de bornyle (5) (bleu) et des produits d'estérifications du (+)-bornéol (7) en vert et (-)-bornéol (7) en rouge

Il est possible de conclure que les estérifications sont complétées avec succès. L'analyse complète du spectre de l'acétate de bornyle (5) est disponible à l'annexe A, entrée 14. En analysant chacun des produits de réaction par GC-FID, les chromatogrammes aux figures 1.28 et 1.29 sont obtenus :

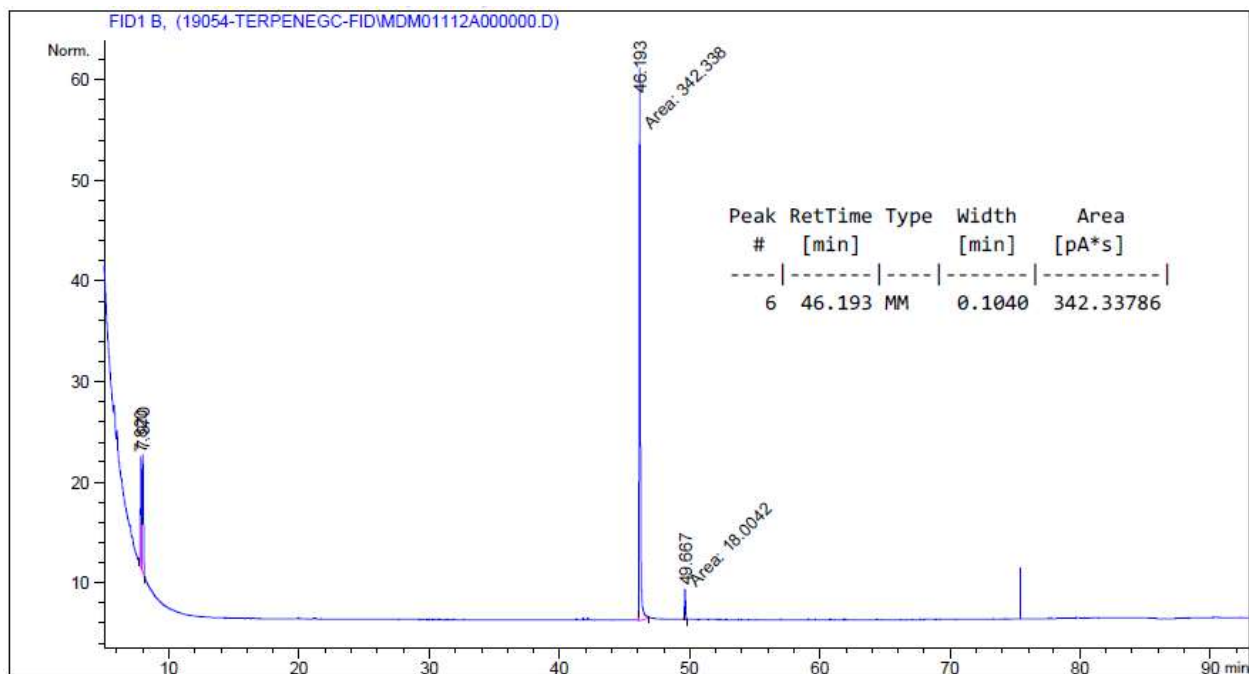


Figure 1.28 Chromatogramme du produit d'estérification du (-)-bornéol (7)

Ce chromatogramme du produit d'estérification du (-)-bornéol (7) n'acétate de bornyle (5) n'a qu'un seul signal à 46,193 min. Le chromatogramme du produit d'estérification du (+)-bornéol (7) en acétate de bornyle (5) est présenté ci-dessous :

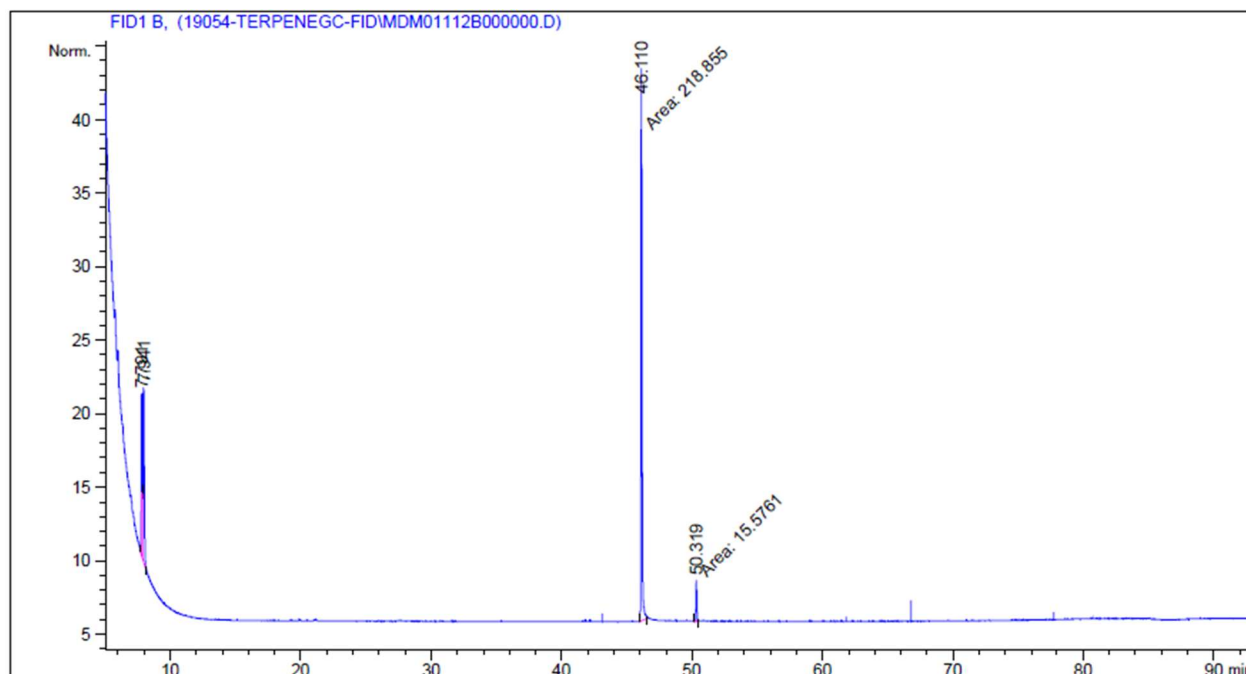


Figure 1.29 Chromatogramme du produit d'estérification du (+)-bornéol (7)

Ce chromatogramme présente lui-aussi un signal à 46,110 min. Ceci est attendu puisque, comme mentionné précédemment, il est impossible de séparer les énantiomères de l'acétate de bornyle (5) par la présente méthode. À ce stade, il est impossible de déterminer quel énantiomère (+ ou -) de l'acétate de bornyle (5) a été formé. Il faut donc avoir recours à la polarimétrie afin de déterminer le signe des acétates de bornyle (5) synthétisés.

L'Université Laval possédant un polarimètre digital dans leurs laboratoires (Annexe A, entrée 12), c'est dans leurs locaux que les analyses ont été réalisées. Un échantillon d'acétate de bornyle (5) commercial de signe (-) a été analysé pour se familiariser avec l'appareil. La valeur attendue, selon le certificat d'analyse était de $-39,8^\circ$ à l'état pur. Puisque la quantité de produit achetée n'était pas suffisante pour une analyse à l'état pur, une solution de 10 mg/mL est préparée dans le méthanol de grade HPLC. Dix mesures sont prises et la moyenne est calculée.

La rotation est calculée selon l'équation suivante :

$$\alpha = \frac{\bar{x}}{(l * C)} \quad (1)$$

Où

α = rotation optique spécifique

\bar{x} = moyenne des rotations optiques mesurées

l = longueur du trajet en décimètre (1 décimètre)

C = Concentration en g/mL de la solution

Les données obtenues sont consignées au tableau 1.5 :

Échantillon		(-)-Acétate de bornyle (5) commercial	Ester du (-)-bornéol (7)	Ester du (+)-bornéol (7)
Concentration	(g/mL)	0,009265	0,01054	0,01122
Rotation mesurée	(°)	-0,355	-0,412	0,437
		-0,362	-0,415	0,428
		-0,362	-0,403	0,435
		-0,366	-0,412	0,438
		-0,363	-0,406	0,435
		-0,367	-0,408	0,426
		-0,365	-0,416	0,426
		-0,366	-0,420	0,421
		-0,367	-0,407	0,433
		-0,361	-0,410	0,427
Moyenne		-0,363	-0,411	0,431
Rotation spécifique	(°)	-39,22 ± 0,40	-38,98 ± 0,49	38,38 ± 0,49

Tableau 1.5 Données de polarimétrie

L'acétate de bornyle (5) commercial, ayant une rotation de -39,8° selon le certificat d'analyse, est ici mesuré à -39,22°, ce qui confirme la valeur du fournisseur. À la suite de cet essai visant à se familiariser

avec l'appareil, les esters des bornéols (+) et (-) ont été analysés de la même manière. Les rotations spécifiques obtenues sont de $-38,98^\circ$ pour l'ester du (-)-bornéol (7) et $38,38^\circ$ pour l'ester du (+)-bornéol (7). Ceci signifie que le (-)-bornéol (7) est estérifié en acétate de bornyle (5) du même signe. Parallèlement, le (+)-bornéol (7) est estérifié en (+)-acétate de bornyle (5).

Schématiquement, le chemin synthétique peut être représenté comme à la figure 1.30 :

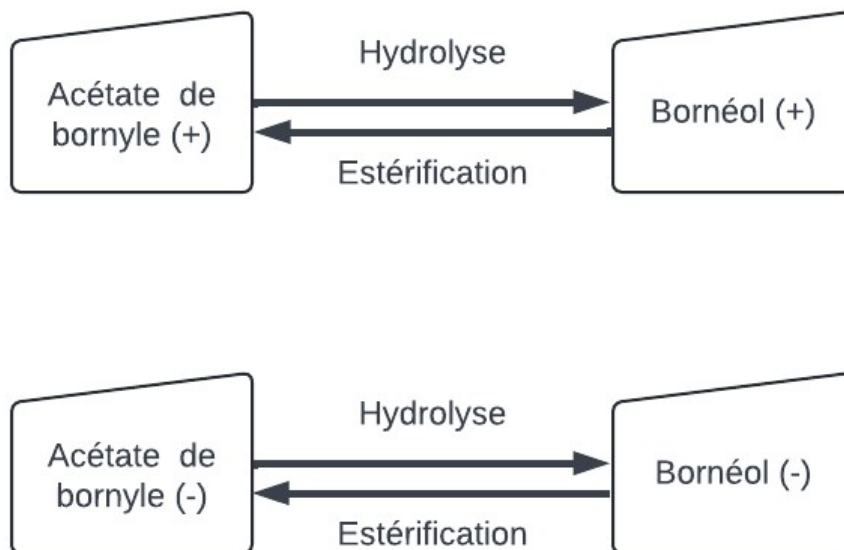


Figure 1.30 Chemin synthétique des transitions entre l'acétate de bornyle (5) et le bornéol (7)

À la lumière de ces informations, il est maintenant possible d'interpréter correctement la figure 1.26. Le chromatogramme de l'hydrolyse du (-)-acétate de bornyle (5) montre un signal à 49,573 min. Celui-ci peut alors être attribué à l'énantiomère (-) du bornéol (7). Ces notions sont importantes lors de l'analyse des composés de départ. Par exemple, si un signal correspondant à l'acétate de bornyle (5) est obtenu lors de l'analyse GC-FID de l'huile essentielle d'épinette noire ou de la térébenthine, l'hydrolyse de ces esters sera réalisée. L'analyse GC-FID montrera des signaux correspondants au (+)-bornéol (7) ou au (-)-bornéol (7). Sachant que l'hydrolyse ne change pas le signe de l'énantiomère du bornéol (7) en résultant, il sera maintenant possible de remonter à l'énantiomère de l'acétate de bornyle (5) correspondant.

Afin de récapituler les données en une référence utile, les résultats issus de la chromatographie chirale en phase gazeuse sont présentés au tableau 1.6 :

Produit	Conformation	# CAS	Temps de rétention
			(min)
α -pinène (1)	+	7785-70-8	22,925
	-	7785-26-4	22,481
	Racémique	80-56-8	22,630/23,168
β -pinène (2)	+	19902-08-0	N/D
	-	18172-67-3	26,498
	Racémique	127-91-3	N/D
Camphène (3)	+	5794-03-6	24,468
	-	5794-04-7	24,960
	Racémique	79-92-5	24,476/24,946
Acétate d'isobornyle (4)	Racémique (S,S,S ou R,R,R)	125-12-2	46,361
Isobornéol (6)	+	16725-71-6	N/D
	-	10334-13-1	N/D
	Racémique	124-76-5	48,831/49,305
Acétate de bornyle (5)	(-) / (1R,2R,4S)	5655-61-8	46,275
	(+) / (1R,2S,4R)	20347-65-3	
	Racémique	76-49-3	N/D
Bornéol (7)	+	464-43-7	50,310
	-	464-45-9	49,588

Tableau 1.6 Temps de rétention GC-FID des énantiomères à l'étude

Les valeurs ici présentées ne doivent cependant pas être prises comme des valeurs absolues. En effet, cette méthode analytique comprend une certaine variation quant aux temps de variation mesurés. Ceci peut provenir d'une multitude de sources dont le traitement des données, le débit de gaz porteur pouvant varier légèrement, de la température du four, etc. Il faut retenir que, si l'on cherche les énantiomères du α -pinène (1) par exemple, l'énantiomère (+) sortira toujours à environ 0,44 minute de plus que l'énantiomère (-). De la même façon, l'énantiomère (+) du camphène (3) sortira toujours environ 0,49 minute plus loin que l'énantiomère (-). L'ordre de détection ne changera pas dans cette colonne, et la différence entre les deux devrait être toujours similaire. De plus, les écarts entre les temps de rétention des molécules étudiées sont suffisamment grands pour qu'il n'y ait pas de superposition des signaux, l'écart le plus faible étant d'environ 1,3 minute. L'ordre entre les molécules ne changera pas non plus tant que la colonne restera la même. Le α -pinène (1) sortira toujours en premier, suivi du camphène (3), du β -pinène (2), du mélange des acétates de bornyle et d'isobornyle et finalement de l'isobornéol (6) et du bornéol (7). Bien que ces deux derniers soient très rapprochés, un mélange d'acétate de bornyle (5) et d'isobornyle est peu probable. En effet, les procédés naturels ont plutôt tendance à former des composés d'une conformation particulière ou énantiomèrement enrichie versus un mélange de diastéréoisomères.^{38 39} Si une telle situation se présente, une analyse croisée des chromatogrammes et des spectres RMN ^1H sera réalisée.

Outillé des informations recueillies, la prochaine étape consistait à caractériser les composés de départ qui seront utilisés pour la synthèse de l'agent antigerminatif.

1.2 Composition de la térébenthine et de l'huile essentielle d'épinette noire

En utilisant la RMN ^1H , la chromatographie chirale en phase gazeuse et les informations recueillies à la section 1.1, il est maintenant possible d'analyser les composés de départ qui seront utilisés. En premier lieu, l'huile essentielle d'épinette noire sera caractérisée. En deuxième lieu, la térébenthine d'épinette noire subira la même analyse et ce, afin de bien connaître les éléments la composant. En dernier lieu, des lots commerciaux d'acétate d'isobornyle (4) testés en entrepôts seront caractérisés.

1.2.1 Composition de l'huile essentielle d'épinette noire

L'huile essentielle d'épinette noire, fournie par Boréa Ressources, a été le produit qui a donné naissance au projet puisqu'elle exhibait des propriétés antigerminatives. La composition de celle-ci avait été déterminée dans le cadre d'un projet précédent réalisé par le partenaire Innofibre. Aucune étude ne peut être citée puisque ces résultats n'ont jamais été publiés, un brevet étant en cours de préparation. Cependant, la composition énantiomérique n'avait pas été déterminée par chromatographie gazeuse puisque la colonne utilisée n'était pas chirale. Le travail réalisé précédemment dans le cadre du présent projet permet maintenant d'obtenir ces informations.

Afin de guider l'interprétation du chromatogramme GC-FID qui sera acquis, la RMN ^1H a premièrement été utilisée afin de déterminer les composés présents. La technique de superposition est parfaitement adaptée à cette première étape. Un agrandissement de la région des signaux caractéristiques des spectres RMN ^1H des produits connus et de l'huile essentielle fournie est présenté à la figure 1.31 :

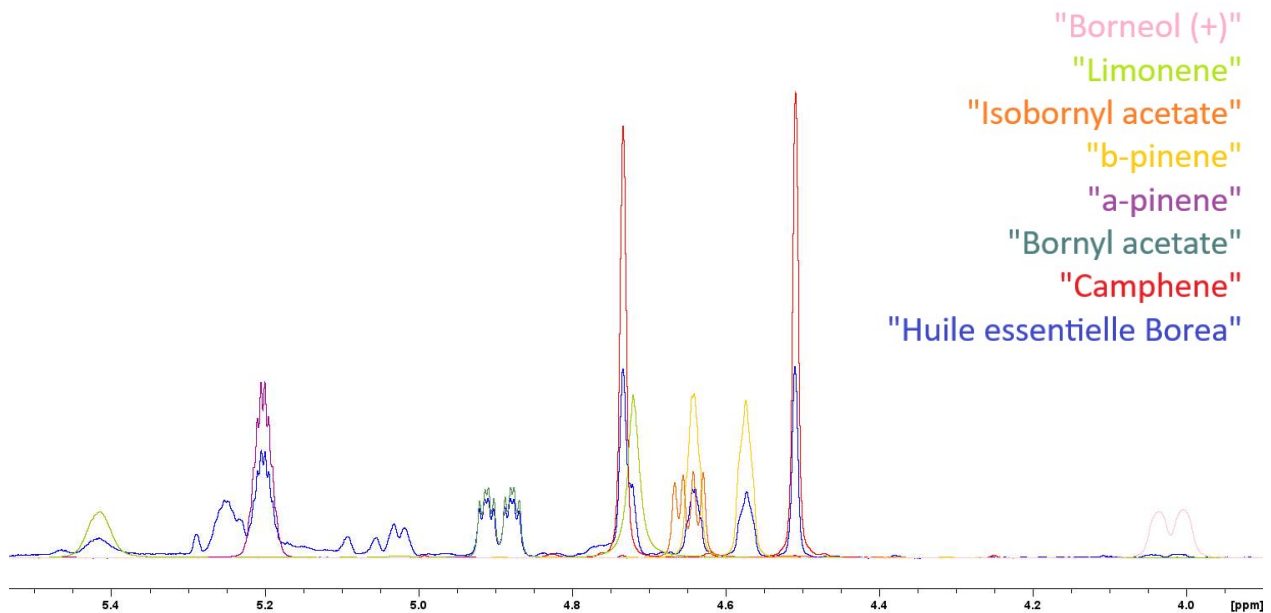


Figure 1.31 Agrandissement de la région caractéristique des spectres RMN ^1H des molécules étudiées dans l'huile essentielle d'épinette noire

Cet agrandissement montre bien la présence de certaines molécules. Premièrement, le α -pinène (1), en mauve, est clairement présent en quantité appréciable. De la même façon, on peut observer le β -pinène (2) et le camphène (3) en jaune et rouge respectivement. L'acétate de bornyle (5) en vert foncé et le bornéol (7) en rose sont aussi présents, ce dernier étant minoritaire dans le mélange. Finalement, un chevauchement peut être observé à 4,72 ppm et l'agrandissement de cette région est présenté à la figure 1.32:

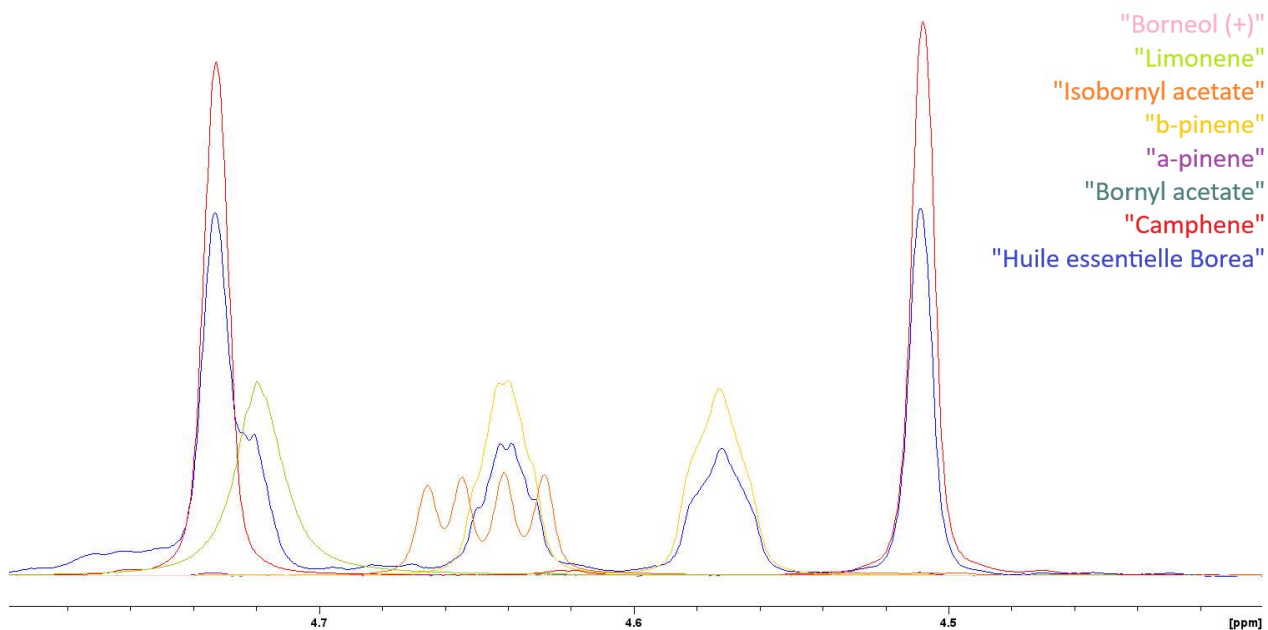


Figure 1.32 Agrandissement de la superposition des spectres RMN ^1H entre 4,40 et 4,80 ppm de l'huile essentielle et des molécules connues

L'épaulement du signal du spectre de l'huile essentielle en bleu et le composé pur en vert pâle est bien visible. Ce spectre est celui du limonène (8), un autre terpène fréquemment rencontré dans les huiles essentielles et qui avait préalablement été identifié par l'équipe de projet.⁴⁰ Le spectre RMN ^1H du limonène (8) pur et le chromatogramme GC-FID sont disponibles aux Annexe C, section 1.2.1 et D, section 1.2.1 respectivement. La liste des molécules connues composant l'huile essentielle étant dressée, le chromatogramme obtenu, à la figure 1.33, peut être interprété avec un niveau de confiance plus élevé :

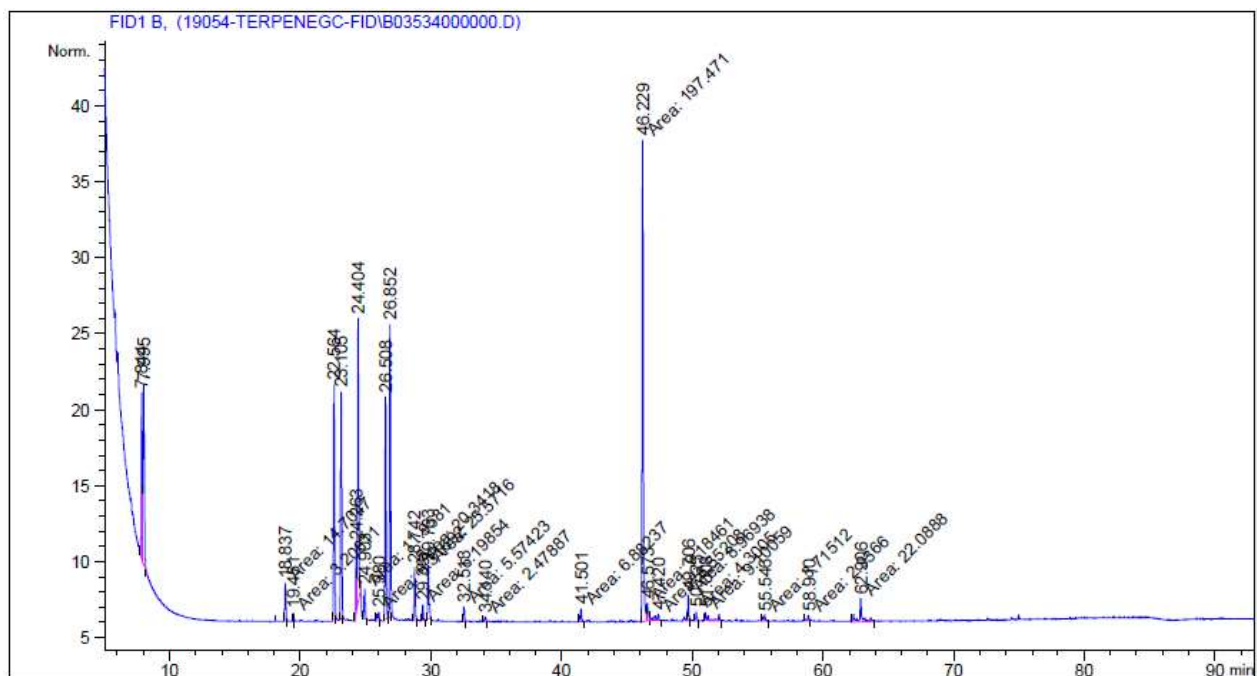


Figure 1.33 Chromatogramme GC-FID chiral de l'huile essentielle d'épinette noire Boréa

Le chromatogramme présente de multiples signaux. Des agrandissements des régions de 18 à 35 min et de 45 à 63 min sont disponibles à l'annexe D, à la section 1.2.1. Selon les temps de rétention déterminés à la section 1.1.4 et disponibles au tableau 1.7, les aires sous la courbe des signaux correspondant aux molécules connues ont été compilées au tableau 1.7 afin de calculer la teneur de chacun dans l'huile essentielle :

Énantiomère	Temps de rétention	Aire sous la courbe	Teneur	Total des énantiomères
	(min)	(pA*s)	(%)	(%)
(+)- α -pinène (1)	23,105	91,63293	10,1	20,7
(-)- α -pinène (1)	22,564	96,08922	10,6	
(+)- β -pinène (2)	26,852	118,99335	13,1	23,0
(-)- β -pinène (2)	26,508	88,89355	9,8	
(+)-Camphène (3)	24,404	121,25486	13,4	14,7
(-)-Camphène (3)	24,903	11,95805	1,3	
(+)-Limonène (8)	29,763	25,57161	2,8	5,1
(-)-Limonène (8)	28,742	20,34184	2,2	
(+)-Acétate d'isobornyle (4)	----	0,00000	0,00	0,00
(-)-Acétate d'isobornyle (4)	----	0,00000	0,00	
(+)-Isobornéol (6)	----	0,00000	0,00	0,00
(-)-Isobornéol (6)	----	0,00000	0,00	
(+)-Acétate de bornyle (5)	46,229	18,38456	2,0	21,8
(-)-Acétate de bornyle (5)		179,08654	19,8	
(+)-Bornéol (7)	50,323	4,30050	0,5	1,5
(-)-Bornéol (7)	49,706	8,96938	1,0	
Total autres	Multiples	120,05786	13,3	13,3

Tableau 1.7 Teneurs calculées par GC-FID chirale pour les molécules connues dans l'huile essentielle d'épinette noire fournie par Boréa

Les signaux ne correspondant à aucune des molécules étudiées ont été combinés en tant que « Total Autres ». Quant à l'acétate de bornyle (5), sa composition énantiomérique a été déterminée à la suite d'une hydrolyse de l'huile (Annexe A, entrée 13) afin de la dériver en bornéol (7). L'analyse GC-FID chirale de cette huile hydrolysée permet d'obtenir les proportions des énantiomères du bornéol (7). Selon le schéma 1.28, il est possible de remonter aux énantiomères de l'acétate de bornyle (5) correspondants. À noter ici que les signaux des bornéols obtenus en GC-FID pour l'huile hydrolysée contiennent à la fois l'acétate de bornyle (5) dérivée et le bornéol (7) retrouvé naturellement dans l'huile essentielle d'épinette noire. La teneur énantiomérique de l'acétate de bornyle (5) est donc légèrement biaisée par le bornéol (7) naturel. Le (-)-acétate de bornyle (5) est toutefois largement majoritaire. Il est intéressant ici de noter que l'huile essentielle ne contient que l'acétate de bornyle (5) et non l'acétate d'isobornyle (4).

Les résultats de cette analyse ont été fournis à l'équipe de projet et aux partenaires afin de compléter leurs propres données acquises précédemment.

Le même raisonnement a ensuite été appliqué à la térébenthine obtenue par le biais de la papetière Westrock située à La Tuque, Québec.

1.2.2 Composition de la térébenthine d'épinette noire

La térébenthine fournie par Westrock a elle aussi été analysée premièrement par RMN ^1H et ensuite par la méthode de GC-FID chirale développée dans le cadre du projet. Celle-ci étant très odorante, elle devra être désodorisée comme il en sera question à la section 1.3. Pour la simplicité de manipulation, la térébenthine utilisée ici était le résultat de cette désodorisation. La RMN ^1H révèle la présence de plusieurs produits connus comme le démontre la superposition à la figure 1.34 :

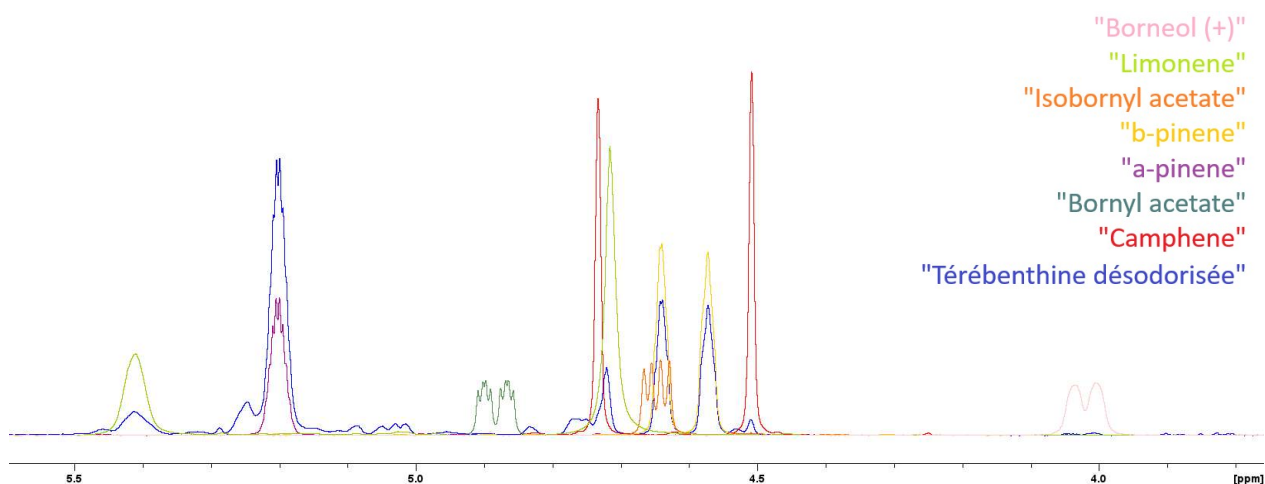


Figure 1.34 Agrandissement de la région caractéristique des spectres RMN ^1H des molécules étudiées dans la térébenthine

Cette superposition démontre la présence de α -pinène (1) en mauve, de β -pinène (2) en jaune et de limonène (8) en vert lime. En moindre concentration, le camphène (3) et le bornéol (7) sont retrouvés en rouge et rose respectivement. Aucun acétate de bornyle (5), d'isobornyle ou d'isobornéol (6) ne sont retrouvés dans la térébenthine. Ceci simplifie l'analyse comparativement à l'huile essentielle précédemment étudiée. Le chromatogramme, présenté à la figure 1.35, est aussi beaucoup plus simple :

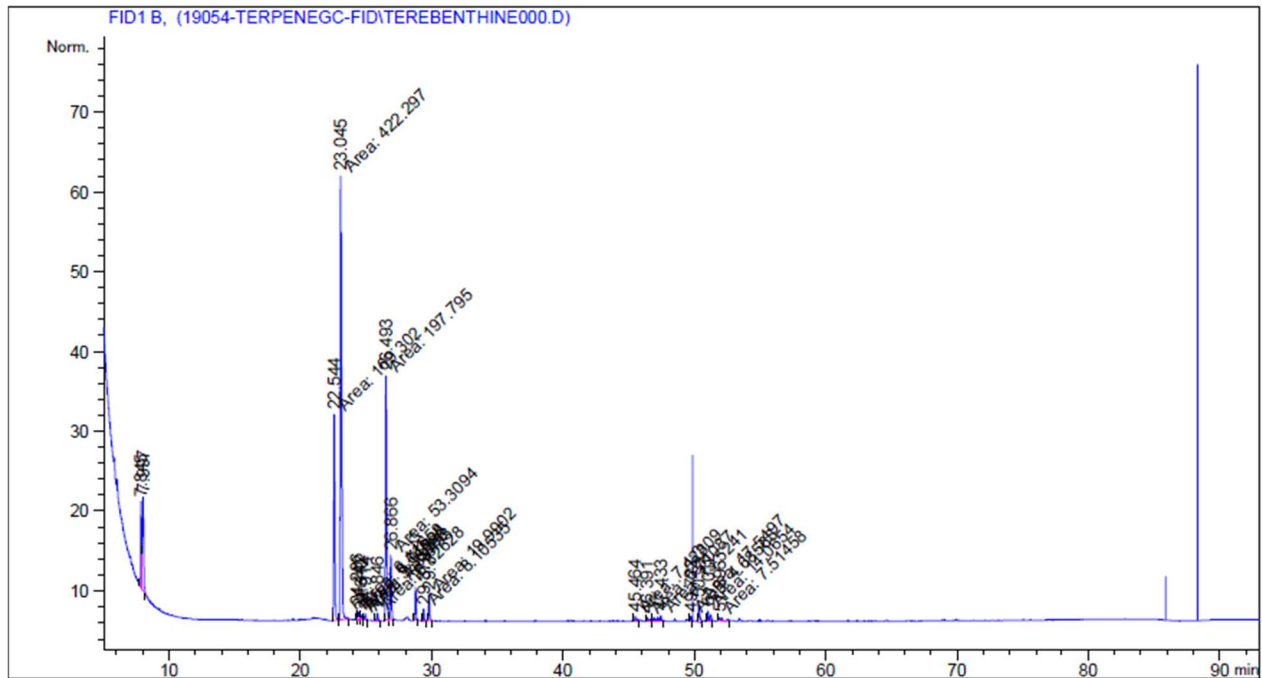


Figure 1.35 Chromatogramme GC-FID chiral de la térébenthine fournie par Westrock

Un agrandissement de ce chromatogramme dans la région plus peuplée entre 21 et 31 minutes est disponible à l'annexe D, section 1.2.2. Selon les temps de rétention déterminés au à la section 1.1.4 et disponibles au tableau 1.7, les aires sous la courbe des signaux correspondant aux molécules connues ont été compilées au tableau 1.8 afin de calculer la teneur de chacun dans la térébenthine :

Énantiomère	Temps de rétention	Aire sous la courbe	Teneur	Total des énantiomères
	(min)	(pA*s)	(%)	(%)
(+)- α -pinène (1)	23,045	422,29666	42,6	59,6
(-)- α -pinène (1)	22,544	169,30243	17,1	
(+)- β -pinène (2)	26,866	53,30941	5,4	25,3
(-)- β -pinène (2)	26,493	197,79463	19,9	
(+)-Camphène (3)	24,442	6,01098	0,6	1,1
(-)-Camphène (3)	24,914	4,79453	0,5	
(+)-Limonène (8)	29,768	19,99022	2,0	4,3
(-)-Limonène (8)	28,747	22,94617	2,3	
(+)-Acétate d'isobornyle (4)	----	0,00000	0,00	0,00
(-)-Acétate d'isobornyle (4)	----	0,00000	0,00	
(+)-Isobornéol (6)	----	0,00000	0,00	0,00
(-)-Isobornéol (6)	----	0,00000	0,00	
(+)-Acétate de bornyle (5)	----	0,00000	0,00	0,00
(-)-Acétate de bornyle (5)	----	0,00000	0,00	
(+)-Bornéol (7)	50,323	17,54972	1,8	2,2
(-)-Bornéol (7)	49,722	4,68563	0,5	
Total autres	Multiples	73,67983	7,4	7,4

Tableau 1.8 Teneurs calculées par GC-FID chirale pour les molécules connues dans la térébenthine fournie par Westrock

Force est de constater que la térébenthine est constituée majoritairement de α -pinène (1) et de β -pinène (2), totalisant presque 85 % de la masse, ce qui concorde avec les données de la littérature ²⁵. Ces deux molécules étant la matière première sur lesquelles les réactions seront réalisées, il est raisonnable de considérer notre produit de départ comme étant pur à 85 %. De plus, le camphène (3), intermédiaire de réaction, est présent à 1,1 %. Idéalement, les autres molécules présentes seront éliminées lors des étapes de purification et n'interféreront pas dans la synthèse. Ces analyses permettent d'affirmer que la matière première est pure à plus de 85 %.

1.2.3 Analyse des lots d'acétate d'isobornyle (4) et de la térébenthine commerciale

Puisque la méthode analytique a été développée, celle-ci a été appliquée aux lots d'acétate d'isobornyle (4) utilisés par le partenaire Agrinova pour les tests antigerminatifs en entrepôt. Ces lots commerciaux ont été acquis entre 2022 et 2024 de fournisseurs divers. Le but était de déterminer la composition énantiomérique des lots d'acétate d'isobornyle (4). De plus, la térébenthine commercialement disponible en quincaillerie a été analysée. Puisque l'approvisionnement en térébenthine de départ n'est pas sécurisé à ce stade, il est possible que des ruptures dans la chaîne d'approvisionnement se présentent. Le pivot vers une source de térébenthine commerciale déjà raffinée et vendue comme solvant vert disponible en grande quantité a été envisagé.

Comme il a été déterminé à la section 1.1.4, les cinq lots d'acétate d'isobornyle (4) doivent être hydrolysés en isobornéol (6) afin de pouvoir être séparés par la méthode GC-FID chirale. La procédure d'hydrolyse est la même que précédemment utilisée ³⁵ et est disponible à l'annexe A, entrée 13. Les esters ont été agités pendant six heures à température ambiante avec une solution 0,3 N d'hydroxyde de sodium dans un mélange méthanol/dichlorométhane 1:9. La conversion complète a été confirmée par RMN ¹H et les échantillons ont ensuite été lavés avec une portion d'eau, séchés au sulfate de sodium et finalement évaporés sous atmosphère réduite. Une solution de 2 mg/mL dans l'heptane HPLC a été préparée pour l'analyse par chromatographie gazeuse. Les résultats sont présentés à la figure 1.36 :

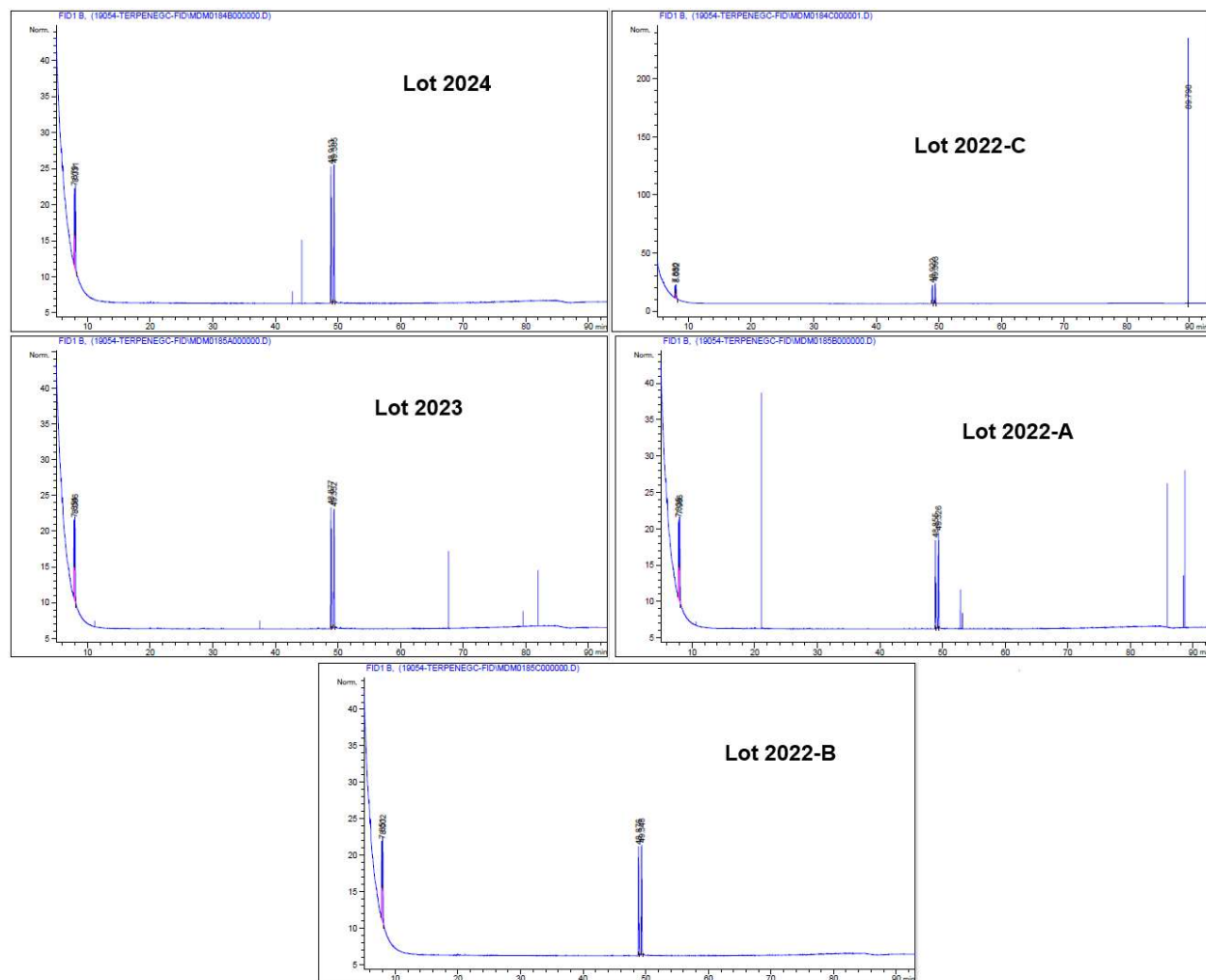


Figure 1.36 Chromatogrammes GC-FID chiraux des lots d'acétate d'isobornyle (4) hydrolysés du partenaire Agrinova

Tous les chromatogrammes présentent deux signaux de même intensité associés aux énantiomères de l'isobornéol (6). Puisque le mécanisme réactionnel est le même que pour les acétates de bornyle précédemment étudiées à la figure 1.28, c'est-à-dire que la réaction inverse de l'estérification des bornéols, soit l'hydrolyse, n'est pas racémisante, cela signifie que les acétates d'isobornyle d'origine sont aussi racémiques. Tous les échantillons d'acétate d'isobornyle (4) obtenus ou étudiés jusqu'à présent sont racémiques. L'hypothèse à ce point est que l'une des réactions produisant l'acétate d'isobornyle (4) est racémisante. Ceci sera étudié davantage à la section 2.4 où le chemin synthétique chiral sera déterminé.

La térébenthine commerciale de marque « *Solvable* », disponible en quincaillerie, est vendue comme solvant vert pour la peinture et est disponible en grande quantité chez les fournisseurs. Il était intéressant de connaître sa composition afin de s'approvisionner de ce produit en cas de rupture de la chaîne d'approvisionnement. La première étape, telle qu'exécutée à la section 1.2.2, est l'analyse RMN ^1H . L'agrandissement de la zone caractéristique de la superposition des spectres est présenté à la figure 1.37 :

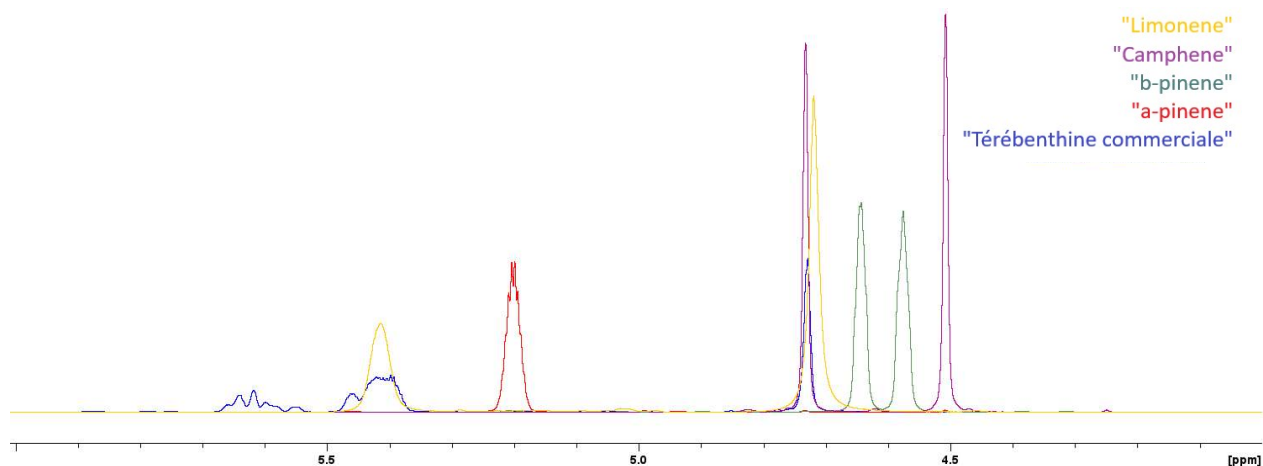


Figure 1.37 Agrandissement de la région caractéristique des spectres RMN ^1H des molécules étudiées dans la térébenthine commerciale « *Solvable* »

À la vue de cette superposition, une information est évidente. La térébenthine commercialement disponible pour le public n'est pas celle issue de l'industrie des pâtes et papier au Québec. Cette composition correspond à un distillat de la térébenthine, ou provient d'une autre espèce végétale, puisque la majorité des térébenthines contiennent une proportion notable de α -pinène (1) et β -pinène (2).⁴¹ Cette térébenthine commerciale ne contient aucun des produits de synthèse désirés pour les besoins du projet soit le α -pinène (1), le β -pinène (2) ou le camphène (3). Celle-ci est majoritairement composée de limonène (8), qui n'intervient pas dans les synthèses prévues. Il est donc impossible de s'en servir comme matière première dans la synthèse de l'agent antigerminatif visé. Il faudra donc se contenter de la térébenthine produite au Québec ou encore au Canada. Sécuriser les matières premières pour une industrie étant cruciale, cette étape devrait être complétée en premier lieu par les partenaires au projet si la synthèse développée dans cette étude était commercialisée.

1.3 Prétraitement de la térébenthine non raffinée

La térébenthine obtenue de chez Westrock est à l'état brut. Aucune purification n'a été réalisée par l'entreprise avant d'envoyer l'échantillon. C'est ce grade qui serait utilisé pour le procédé envisagé dans la synthèse de l'agent antigerminatif. Elle dégage une forte odeur soufrée incommode et il est impossible de la manipuler sans masque à cartouches ou respirateur autonome. Cette odeur provient du procédé utilisé dans la production des pâtes et papier Kraft qui utilise un composé soufré et génère des sous-produits qui seront eux-mêmes soufrés.⁴² Il est donc impératif de la purifier avant de procéder. L'analyse de la térébenthine par RMN du proton dans le chloroforme deutéré est présentée à la figure 1.38 :

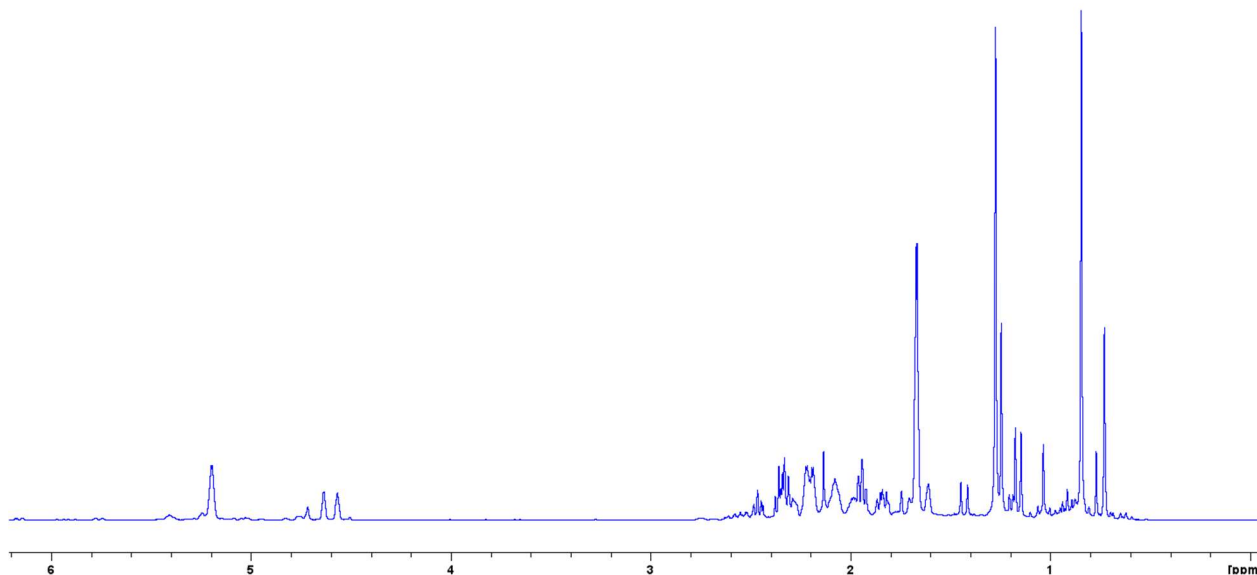


Figure 1.38 Spectre RMN ¹H de la térébenthine brute

La térébenthine étant un mélange de produits comme déterminé à la section 1.2.2 le spectre en soi est assez complexe. L'assignation de chaque signal à une molécule relève d'un travail minutieux et requiert un appareil RMN plus performant que celui utilisé. De plus, la composition a déjà été déterminée précédemment à la section 1.2.2. Cependant, l'odeur soufrée provient habituellement de composés assez simples chimiquement. Par exemple, le sulfure d'hydrogène (H₂S) et le sulfure de diméthyle (CH₃)₂S sont communément détectés dans les procédés industriels impliquant des réactifs soufrés.^{43 44} À grande

échelle, la méthode d'oxydation par l'hypochlorite de sodium (NaClO)⁴⁵ est la plus simple et rapide à réaliser. Cette méthode consiste à mélanger le produit odorant avec de l'hypochlorite de sodium concentré sous agitation afin d'oxyder les composés soufrés en composés moins volatiles et de les rendre solubles dans la phase aqueuse. Un lavage à l'eau est ensuite réalisé pour nettoyer la phase organique et ainsi éliminer les composés soufrés. Après un séchage par un agent asséchant comme le sulfate de sodium, le produit obtenu est sec et ne devrait plus présenter d'odeur nauséabonde.

1.3.1 Désodorisation de la térébenthine brute à l'échelle laboratoire

Un essai à petite échelle a été réalisé pour vérifier l'efficacité de la méthode. Dans un contenant agité sous une hotte chimique bien ventilée, 2 mL de térébenthine brute ont été ajoutés suivi de 2 mL d'hypochlorite de sodium industriel à 12 % de concentration. Lors de l'ajout, un léger exotherme a été détecté au toucher. Cette information est cruciale lors de la mise à l'échelle puisqu'un exotherme mineur à l'échelle laboratoire peut rapidement devenir une réaction incontrôlable à l'échelle pilote. Le mélange a été agité pour une durée d'une heure. Les phases organiques et aqueuses ont été séparées et aucune émulsion n'a été observée à cette étape. Une fois la phase organique séparée et séchée sur sulfate de sodium anhydre, elle présentait une odeur agréable de résineux et aucune trace odorante de soufre. Cet échantillon a été analysé par spectroscopie RMN du proton dans le chloroforme deutéré et le spectre a été superposé avec celui de la térébenthine brute obtenu précédemment. Cette superposition est présentée à la figure 1.39 :

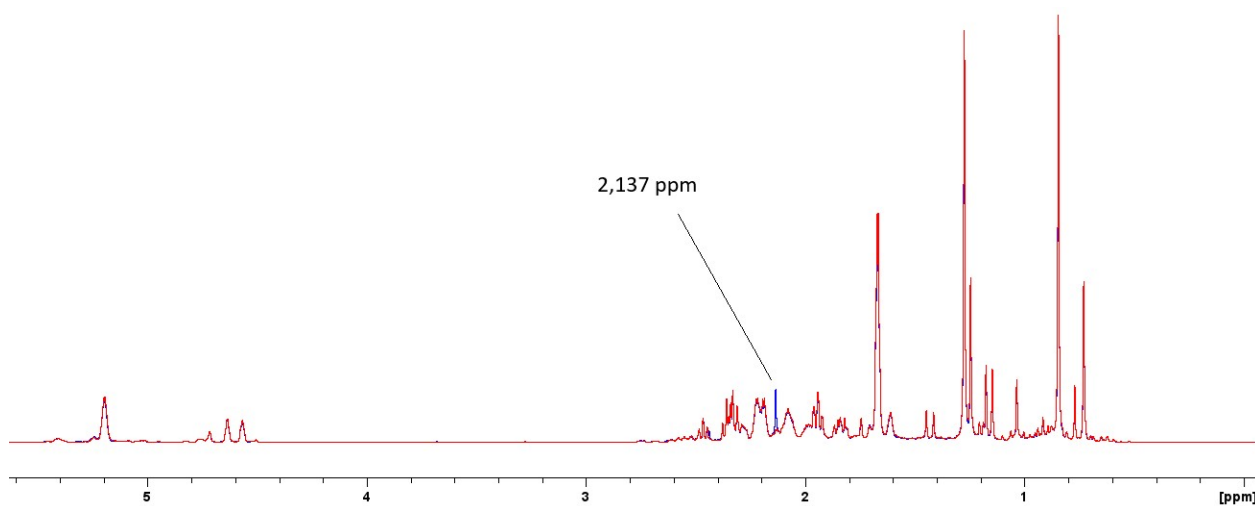


Figure 1.39 Superposition des spectres RMN ^1H de la térébenthine brute (bleu) avec la térébenthine désodorisée à l'échelle laboratoire

Le spectre de la térébenthine désodorisée en rouge est superposé avec celui de la térébenthine brute en bleu. La seule différence notable est un singulet à 2,137 ppm disparaissant après traitement. Selon la littérature, ce signal pourrait appartenir au sulfure de diméthyle $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ générant l'odeur soufrée.⁴⁶ L'oxydation le transforme en composés solubles dans la phase aqueuse dont le diméthyle sulfone et le diméthylsulfoxyde.⁴⁷ L'odeur de cette térébenthine traitée est beaucoup plus tolérable et c'est une étape qui devra être réalisée avant de passer aux réactions de synthèse proprement dit.

1.3.2 Désodorisation de la térébenthine brute à l'échelle pilote

L'essai en laboratoire étant concluant, la prochaine étape consistait à traiter le lot de térébenthine brute reçue comme échantillon. Cette manipulation a été réalisée dans un réacteur Chemglass 30 L muni d'une agitation (annexe A, entrée 11) à l'usine pilote. Puisque le réactif de départ est très odorant et que le contrôle des odeurs aurait été un défi de taille, les transferts initiaux ont été réalisés à l'extérieur de l'usine pilote. Un volume de 12 L de térébenthine brute a premièrement été ajouté au réacteur. Le chauffage était inactif, mais le thermocouple était inséré dans la solution afin d'observer la montée de température. Le serpentin de refroidissement n'avait pas été installé. Plutôt, le contrôle de l'exotherme serait obtenu en contrôlant l'ajout de l'hypochlorite de sodium. Sous agitation à 200 rpm, l'hypochlorite de sodium 12 % a été ajouté. Une première portion de 3,6 L a été ajoutée et la température a augmenté de 23 °C à 43 °C en sept minutes. À ce stade, deux options étaient disponibles pour abaisser la température. La première consistait simplement à attendre que la chaleur se dissipe d'elle-même. La deuxième consistait à ajouter de l'eau froide, voire de la glace au réacteur. Puisque l'hypochlorite de sodium est une solution dans l'eau, un peu plus d'eau ne pouvait avoir d'effet néfaste sur la réaction. Il a donc été décidé d'y aller avec la deuxième option en ajoutant de la glace pour baisser sous la barre des 30 °C. Une deuxième portion de 3,6 L d'eau de javel concentrée a été ensuite ajoutée lentement et la température a remonté à 42 °C après l'ajout. Une autre quantité de glace a été ajoutée pour baisser la température à 31 °C et une dernière portion de réactif, d'un volume d'environ 1L a été ajoutée. Les volumes sont évalués par le volume inscrit sur les contenants de réactifs ou le cas échéant, par l'augmentation du volume du réacteur. L'agitation a été maintenue pour une heure afin de permettre à la réaction de se compléter et à la chaleur de se dissiper. Ensuite, l'agitation a été coupée pour permettre la séparation des phases organiques et aqueuses. Une séparation nette a été observée après dix minutes. La phase aqueuse (en dessous) a été doucement vidée par la valve sous le réacteur. Cette phase aqueuse a été transférée dans un baril pour neutralisation future. Un lavage à l'eau a été réalisé pour laver la phase organique et une séparation des phases a suivi. Cette

deuxième phase aqueuse a été combinée avec la première dans le baril. Dans le but d'éliminer toute eau résiduelle dans la térébenthine, une masse de 5 kg de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) a été ajoutée dans le réacteur sous agitation. Après une agitation d'une durée d'une heure, la suspension a été vidée progressivement dans un système de filtration sous vide par Büchner. Sur le filtre Fisher P8 de porosité nominale 25 μm , le sulfate de sodium a été récupéré pour être ensuite rejeté dans un contenant approprié. Le filtrat de térébenthine, sec et clair, a été stocké dans une chaudière de plastique scellée et identifiée. C'est ce produit désodorisé qui sera utilisé comme matière première pour les réactions dans le cadre du projet. Le spectre RMN ^1H de ce lot est présenté à la figure 1.40 :

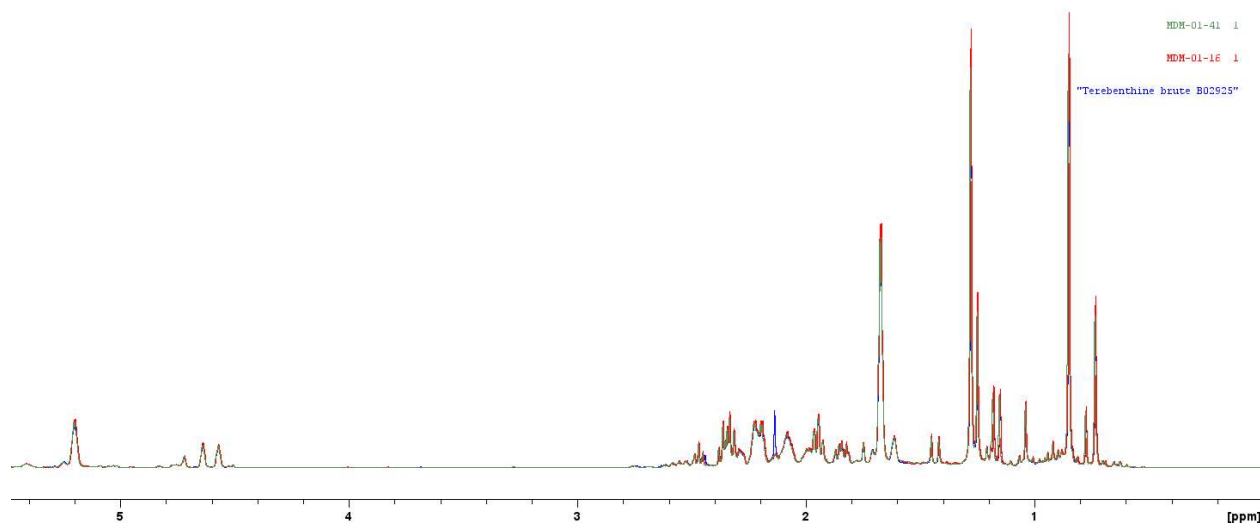


Figure 1.40 Superposition des spectres RMN ^1H de la térébenthine désodorisée à l'échelle pilote (vert) sur la térébenthine brute (bleu) et la térébenthine désodorisée à l'échelle laboratoire (rouge)

Le spectre RMN ^1H est identique à celui obtenu après désodorisation à petite échelle. Il est raisonnable de supposer que la composition de la térébenthine est demeurée identique. Si tel n'était pas le cas, il y aurait des changements d'intensité, de déplacement chimique ou de multiplicité au niveau des signaux RMN observés. Une fois la désodorisation du lot de térébenthine complétée, le produit avait une odeur agréable de bois résineux et pouvait être manipulé sans risque de contaminer l'air ambiant d'odeurs nauséabondes.

Les travaux suivants étudieront la transformation de cette térébenthine selon deux réactions subséquentes dans le but d'obtenir le produit agissant comme antigerminatif.

CHAPITRE 2

Synthèse de l'agent antigerminatif

Dans ce chapitre, les réactions seront étudiées. Premièrement, les conditions réactionnelles de l'isomérisation du α -pinène (1) et β -pinène (2) en camphène (3) sera examinée sous plusieurs coutures. La confection du catalyseur, la charge catalytique et la température sont tous des facteurs qui ont été testés afin d'en ressortir les conditions idéales. La réaction sera premièrement étudiée en lot et les informations obtenues seront transposées à un système de chimie en continu dont les propriétés devront elles aussi être calculées. Finalement, la méthode de purification du mélange réactionnel sera déterminée afin d'obtenir un camphène (3) le plus pur possible. Suivant cette étape, l'étude de la réaction d'estérification menant à l'acétate d'isobornyle (4) suivra le même raisonnement en lot et dans un système en continu. Cette réaction étant différente de la précédente par le fait qu'elle utilise un deuxième réactif ainsi qu'un catalyseur commercial, les aspects à l'étude seront eux-mêmes différents. La température et les équivalents de réactif sont des exemples de facteurs qui devront être définis. En plus, la possibilité de combiner les deux réactions en une seule manipulation devra être validée ou invalidée. Ensuite, le chemin synthétique quant à la chiralité sera étayé puisque cette propriété est d'une importance capitale lors de la mise en marché de produits pouvant entrer en contact avec le corps humain et affectant les aliments. Toutes ces informations mèneront à une étape de preuve de concept où les réactions seront combinées dans un procédé complet visant à déterminer la faisabilité industrielle de la synthèse de l'acétate d'isobornyle (4). Finalement, le coût de production de ce produit selon les conditions établies sera évalué. Ce coût sera comparé aux traitements actuels, donnant tous les outils nécessaires à un partenaire industriel intéressé à produire l'agent antigerminatif selon les réactions étudiées dans ce projet pour faire des choix éclairés.

2.1 Isomérisation du α -pinène (1) et β -pinène (2)

La première réaction à l'étude dans ce projet était la transformation du α -pinène (1) et du β -pinène (2) en camphène (3) nommée isomérisation. L'isomérisation est la conversion d'une molécule en une autre, sans changer sa formule empirique, mais seulement en changeant sa structure et les connexions entre les atomes. Par exemple, l'isopropanol et le propanol possèdent toutes deux la formule empirique $C_3H_8O_1$, mais leur structure est différente comme démontré à la figure 2.1 :

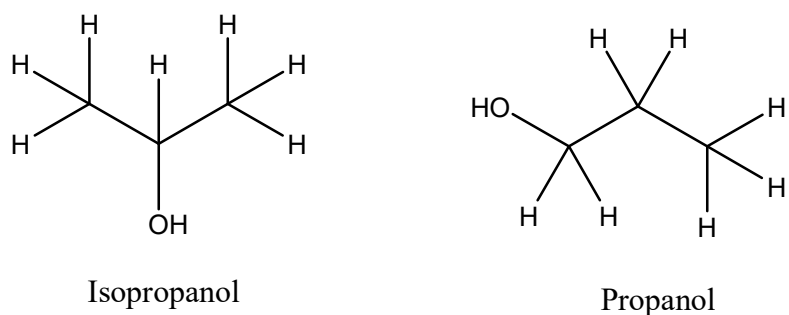


Figure 2.1 Structure chimique de l'isopropanol et du propanol

Le cas est le même pour les deux réactifs de départ, le α -pinène (1), le β -pinène (2) ainsi que pour le camphène (3) et un sous-produit potentiel, le limonène (8). Ces composés possèdent la formule empirique $C_{10}H_{16}$, mais la figure 2.2 présente leurs structures différentes :

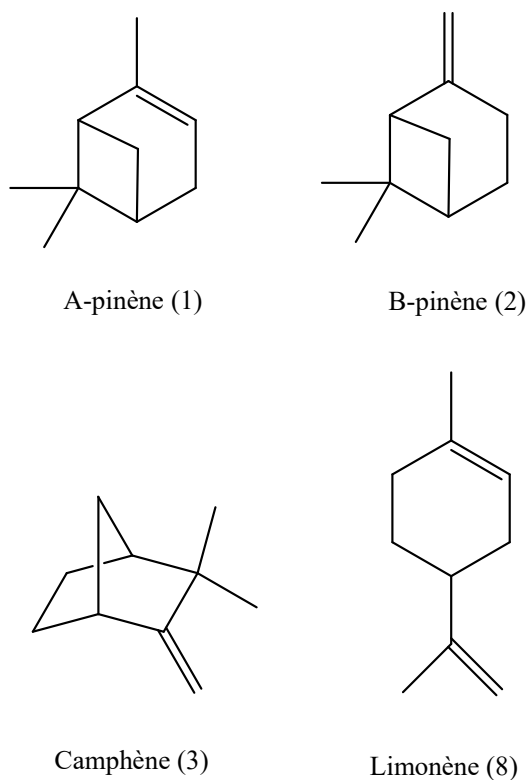


Figure 2.2 Structure chimique du α -pinène (1), β -pinène (2), camphène (3) et limonène (8)

Notamment, la position de la double liaison est différente dans les trois cas. Elle peut être soit à l'intérieur du cycle ou terminale. Outre le camphène (3) désiré, le limonène (8), molécule identifiée à la section 1.2 est aussi un isomère $C_{10}H_{16}$ et peut possiblement être formé lors de la réaction. Sa présence sera suivie lors de l'interprétation des résultats des synthèses.

Le mécanisme de l'isomérisation du α -pinène (1) en camphène (3), présenté à la figure 2.3, repose sur la migration du carbocation après acidification, du réarrangement spatial de la molécule et ultimement du déplacement de la double liaison après sa déprotonation. Ce mécanisme générique peut résulter en de multiples composés mono, bi ou même tricycliques comme le démontre celui tiré de la littérature : ⁴⁸

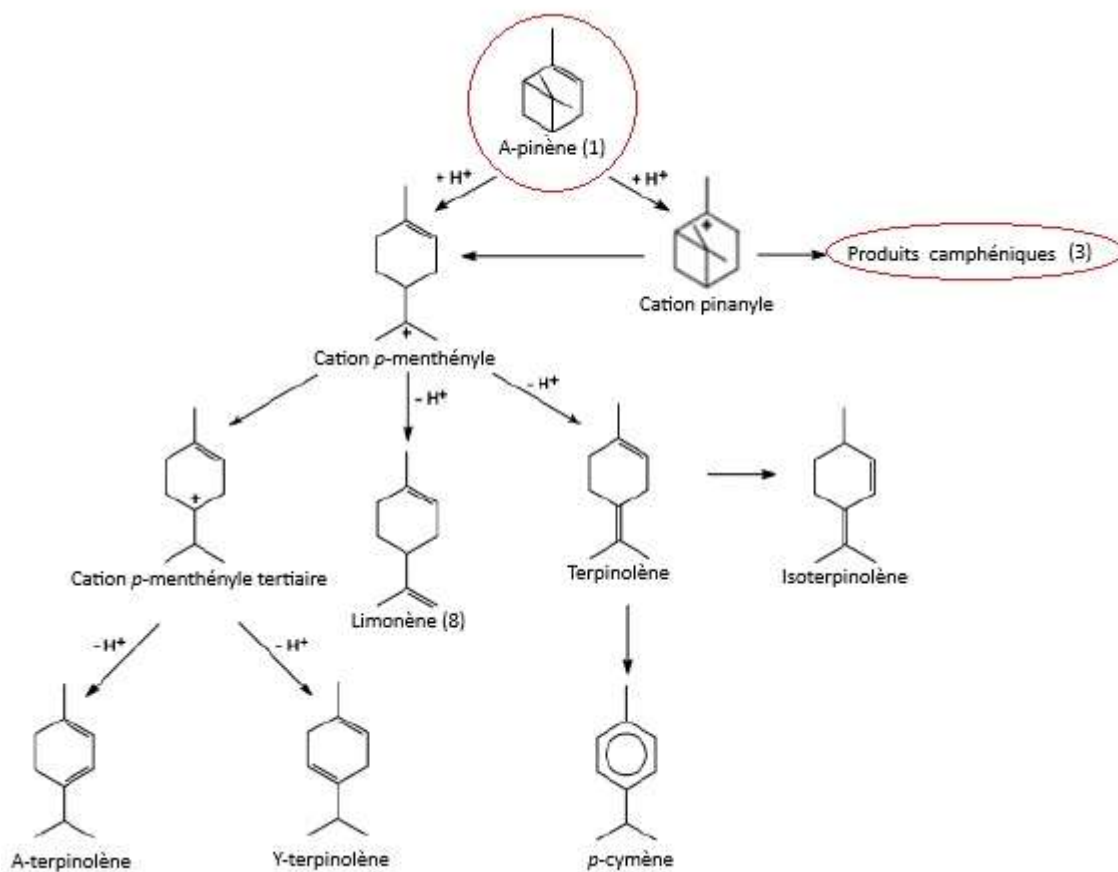


Figure 2.3 Schéma réactionnel de l'isomérisation du α -pinène (1) tiré de la littérature ⁴⁸

De plus, le α -pinène (1) peut s'isomériser en β -pinène (2), ce qui multiplie davantage les chemins réactionnels possibles comme le montre la figure 2.4 : ⁴⁹

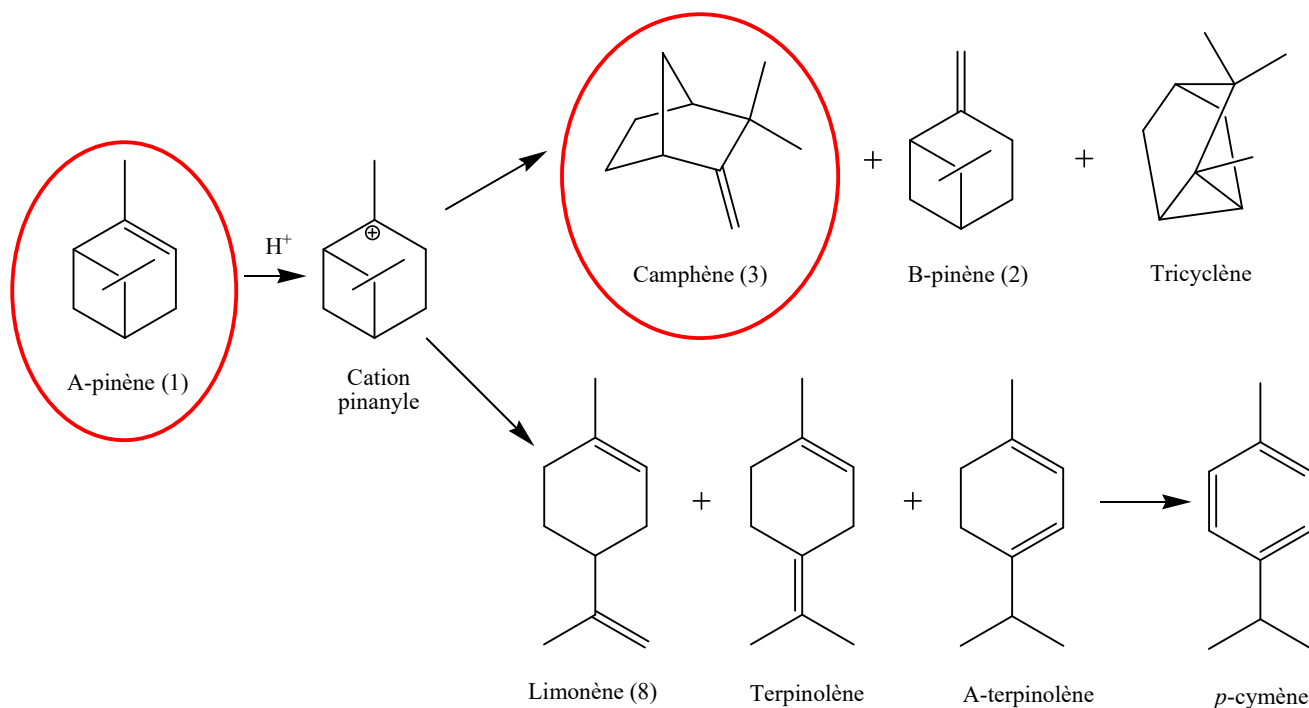


Figure 2.4 Schéma réactionnel de l'isomérisation du α -pinène (1) en β -pinène (2)

Les sous-produits de l'isomérisation sont multiples. Par exemple, le β -pinène (2) peut aussi s'isomériser, mais sa génération n'est pas un désavantage, s'il est converti à son tour en camphène (3). Le β -pinène (2) sera aussi quantifié dans les mélanges réactionnels lorsque présent.

Afin d'étudier convenablement la réaction, le α -pinène (1) commercial a été utilisé. L'utilisation de la térébenthine à ce stade pourrait compliquer l'interprétation des résultats. C'est pourquoi utiliser des produits purs et déjà caractérisés est avantageux.

2.1.1 Synthèse des nanotubes d'oxyde de titane (IV)

Pour la synthèse du camphène (3) par l'isomérisation du α -pinène (1), plusieurs catalyseurs acides de la littérature ont été considérés tels que des composés d'aluminium, de titane et d'or ou même en phase gazeuse.^{50 51 52 49} Cependant, les critères de sélection du catalyseur, si les concepts de la chimie verte sont suivis, se doit d'être réutilisable, ne pas générer de rejets, être le plus sécuritaire possible et ne pas nécessiter de réactifs dispendieux ou néfastes pour l'humain et l'environnement.¹⁷ En ce sens, l'utilisation d'acides inorganiques tels que l'acide chlorhydrique ou sulfurique n'est pas viable et le choix s'est posé sur un catalyseur de nanotubes à base d'oxyde de titane TiO_2 .⁵³ Ce dernier est un composé non toxique, couramment utilisé dans de multiples industries tel que les polymères et la peinture et est abondant ainsi que non coûteux. L'oxyde de titane se présente sous trois arrangements soit rutile, brookite et anatase. Les deux polymorphes rutile et anatase, plus communs, possèdent leurs avantages et ont été étudiés dans le présent travail.⁵⁴ Il est à noter que ce catalyseur est différent de celui impliquant l'hydrate de TiO_2 protégé par un brevet canadien datant de 2016 ce qui évite les complications légales.⁵⁵ La morphologie en nanotubes est avantageuse pour sa grande surface spécifique (2 à 3 fois supérieure à une surface plane) et sa grande porosité (50-200 m^2/g) et donc, sa potentielle grande activité catalytique comparativement à une poudre formée de particules sphériques ou irrégulières.⁵⁶ La synthèse est simple et implique de dissoudre l'oxyde de titane dans une solution d'hydroxyde de sodium concentrée. La solution est laissée au repos à chaud et les nanotubes formés sont ensuite filtrés et lavés avec une solution acide.

La référence suggère plusieurs acides, mais selon les résultats publiés, le lavage à l'acide chlorhydrique a été choisi puisque les nanotubes lavés à l'aide de cet acide convertissent davantage et plus sélectivement le α -pinène (1) en camphène (3).

Un point à noter : L'isomérisation en présence de catalyseur semble inévitablement produire une proportion notable de limonène (8). Cette valeur sera déterminée lorsque pertinent afin de connaître la sélectivité après la conversion complète du α -pinène (1) et β -pinène (2).

Les nanotubes de TiO_2 ont été synthétisés selon la procédure de la littérature⁵³ dans le réacteur à haute pression et haute température (Annexe A, entrée 9) puisque la température de la synthèse excédait la température d'ébullition de l'eau et une génération de pression était possible. Cette procédure est disponible à l'annexe A, entrée 16. La caractérisation a été réalisée par microscopie électronique. Premièrement, la microscopie électronique à balayage couplée à un détecteur de spectroscopie de rayons

X à dispersion d'énergie (Annexe A, entrée 5) a été utilisée pour sa facilité de préparation de l'échantillon. Une suspension dans le méthanol suivie d'une déposition sur le ruban adhésif de carbone a été suffisante. Les images obtenues, telles qu'à la figure 2.5, n'étaient cependant pas très concluantes pour déterminer si des nanotubes ou autre structure avaient été formées :

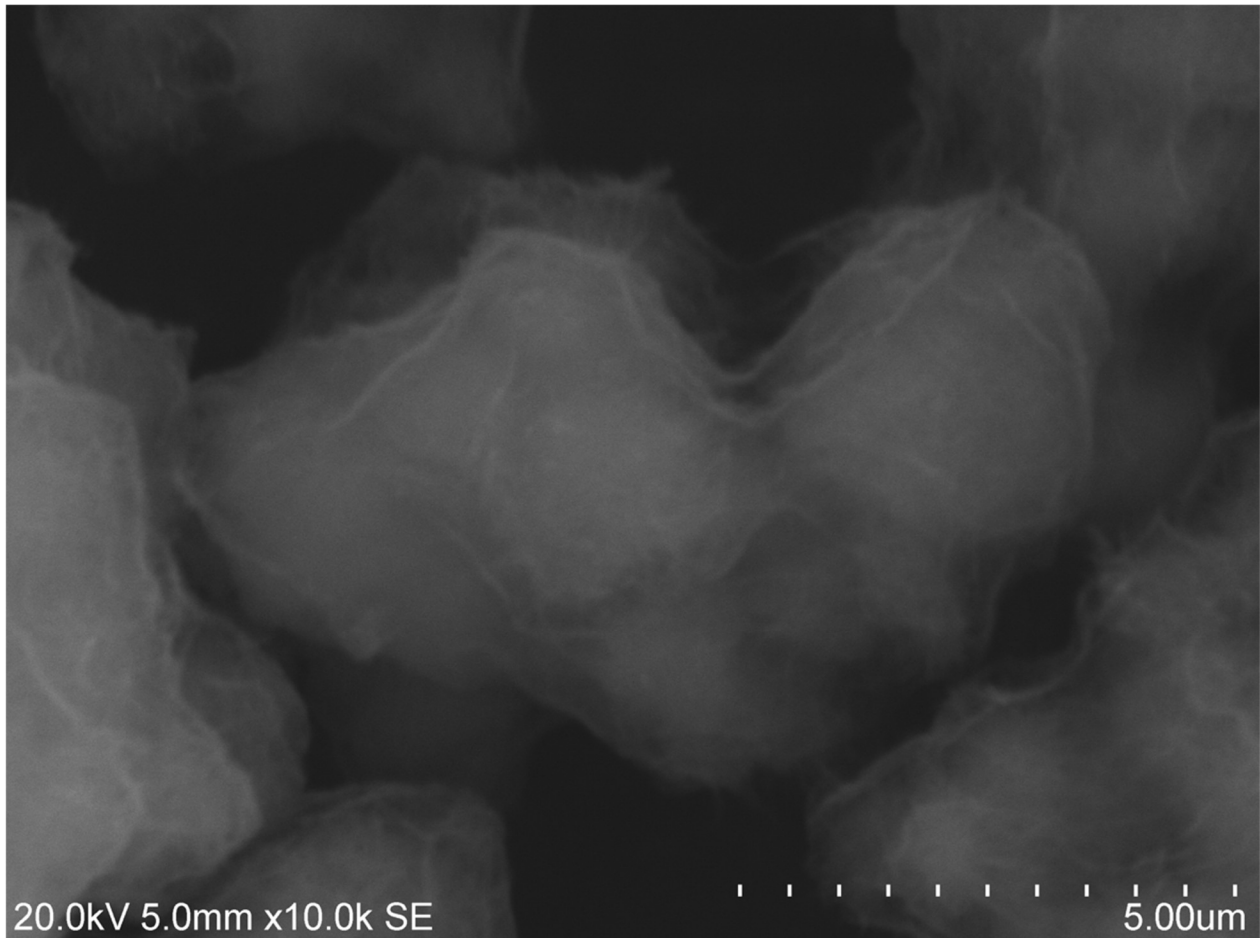
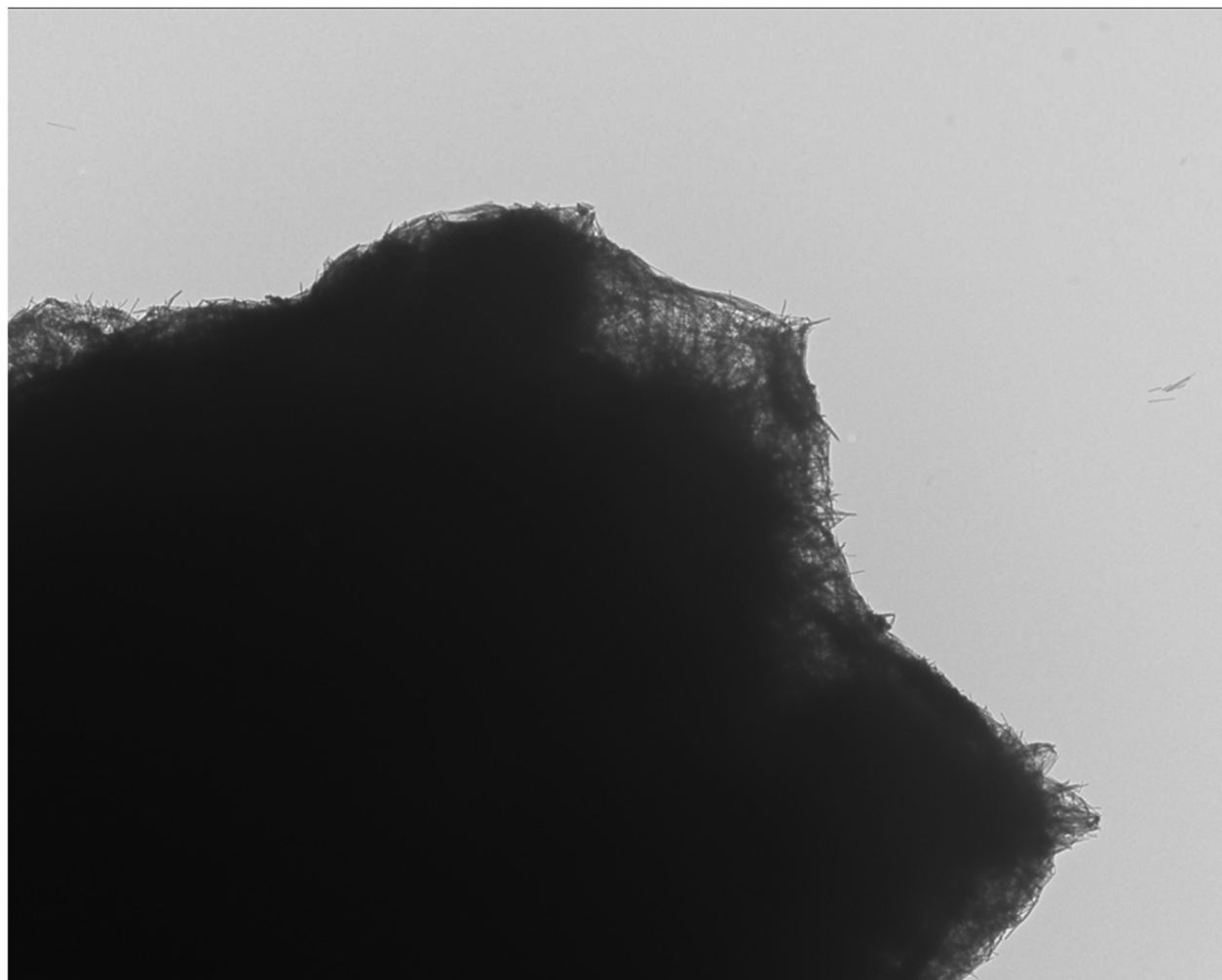


Figure 2.5 Image MEB de la synthèse des nanotubes

Des canaux ou filaments sont observés, mais rien ne permet d'identifier des structures particulières. La microscopie électronique à transmission (Annexe A, entrée 6) a donc été utilisée pour sa plus grande capacité de grossissement et donc, sa meilleure résolution. De multiples images ont été prises, mais les plus parlantes sont présentées aux figures 2.6 et 2.7 :



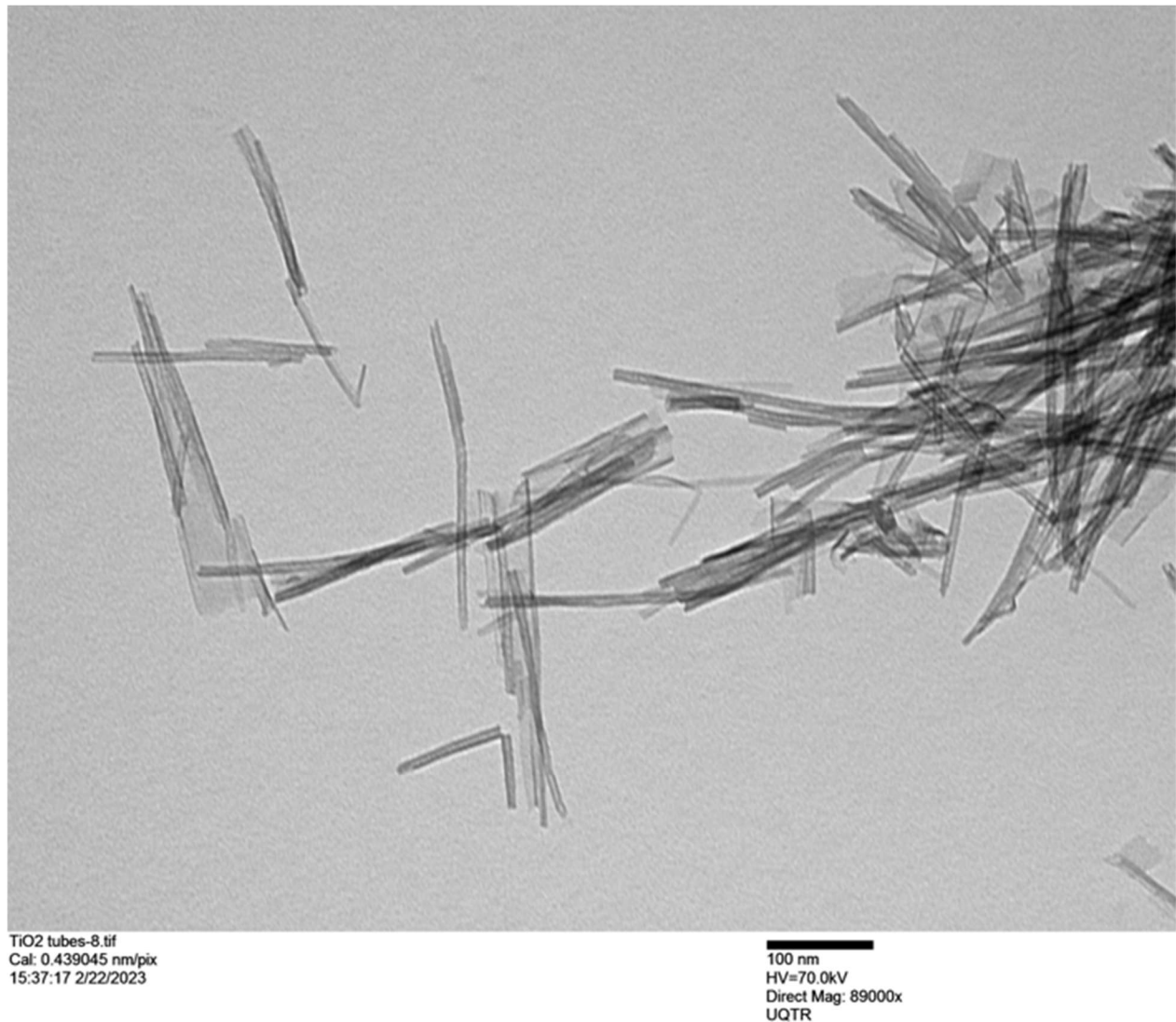
TrO2 tubes-5.tif
Cal: 0.002590 $\mu\text{m}/\text{pix}$
15:34:51 2/22/2023

800 nm
HV=70.0kV
Direct Mag: 14000x
UQTR

Figure 2.6 Image MET d'un agrégat issu de la synthèse des nanotubes

Un réseau d'aiguilles compactes est observable sur cette image. Afin de confirmer si ce sont des aiguilles, des tubes ou des bâtonnets, une autre image a été acquise :

Figure 2.7 Image MET du solide synthétisé



Ici, les aiguilles précédemment observées sont représentées. La MET visionne l'échantillon du dessus, et les électrons doivent passer à travers celui-ci afin d'être captés par le détecteur et donc, les parois plus foncées suggèrent une épaisseur différente du centre, menant à la conclusion que ce sont des tubes et non des bâtonnets. Un bâtonnet serait représenté par une épaisseur plus importante au centre qu'au pourtour. Il est donc raisonnable de conclure que cette synthèse mène en effet à des tubes, de diamètre d'environ 10 à 20 nm et de longueur variant de 100 à 500 nm selon l'image. L'activité catalytique de ce catalyseur a ensuite été évaluée en le mettant dans les conditions d'isomérisation.

Dans un flacon, 20 g de α -pinène (1) et 1 g de catalyseur (charge catalytique de 5 %) ont été ajoutés et agités avec un barreau magnétique. Le flacon a été placé dans un bain d'huile chauffé à 100 °C et un suivi par RMN ^1H a été réalisé. Le traitement des spectres RMN est réalisé selon les informations déterminées à la section 1.1.3, soit en ciblant les signaux caractéristiques. Les signaux caractéristiques RMN ^1H des composés à l'étude sont rappelés au tableau 2.1, en ajoutant maintenant la valeur du limonène (8) :

Produit	RMN ^1H	
	δ chimique (ppm)	Nbre de protons
α -pinène (1)	5,20	1
β -pinène (2)	4,57/4,64	1/1
Camphène (3)	4,73/4,51	1/1
Limonène (8)	5,41/4,71	1/2
Acétate d'isobornyle (4)	4,65	1
Acétate de bornyle (5)	4,88	1

Tableau 2.1 Signaux caractéristiques RMN ^1H des molécules étudiées

Le spectre RMN ^1H du mélange réactionnel dans le CDCl_3 après une heure à la température d'isomérisation a été obtenu et est présenté à la figure 2.8 :

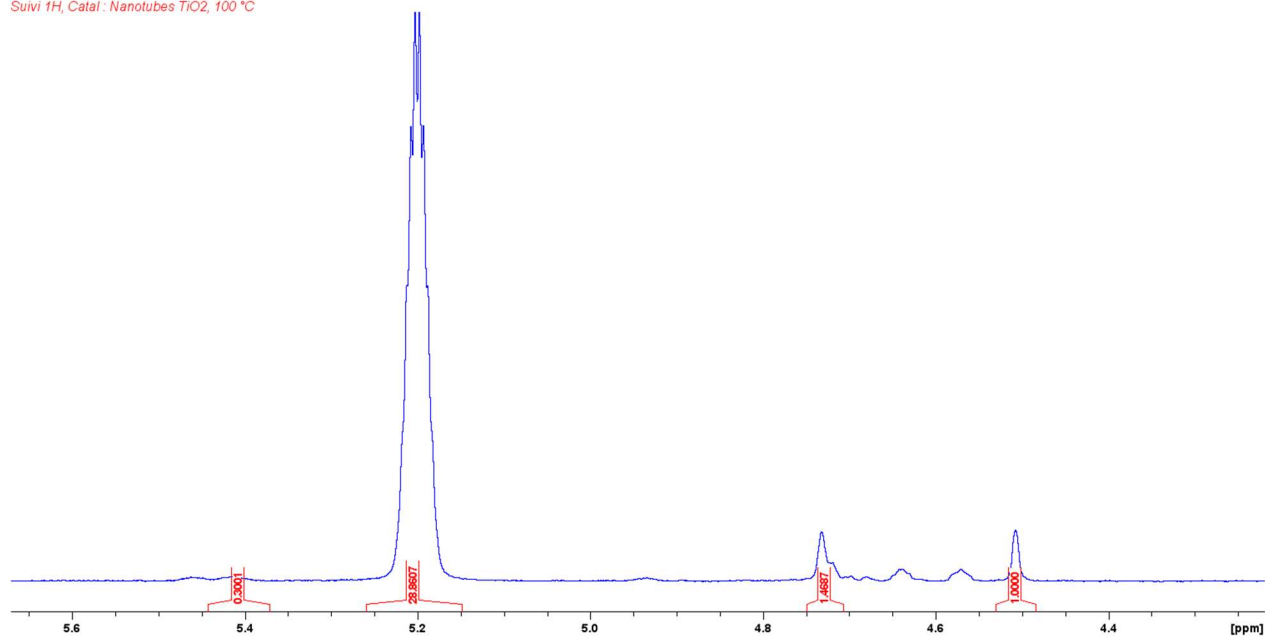


Figure 2.8 Spectre RMN ^1H du mélange réactionnel à une heure de temps de contact

Les intégrations des signaux caractéristiques, soit 5,20 ppm pour le α -pinène (1) et 4,51 ppm pour le camphène (3) sont de 28,861 et 1,000 respectivement. Chacun de ces signaux représente un proton sur leur molécule respective. Il est donc possible, en divisant les valeurs, d'obtenir un pourcentage molaire et donc une conversion représentant l'avancement de la réaction. Ici, un avancement de 3,3 % est calculé. Le suivi a été poursuivi pendant cinq heures additionnelles pour un total de six heures. Les spectres RMN ^1H ont été obtenus et traités comme précédemment. Les conversions sont colligées à la figure 2.9 afin de visualiser la conversion du α -pinène (1) en fonction du temps :

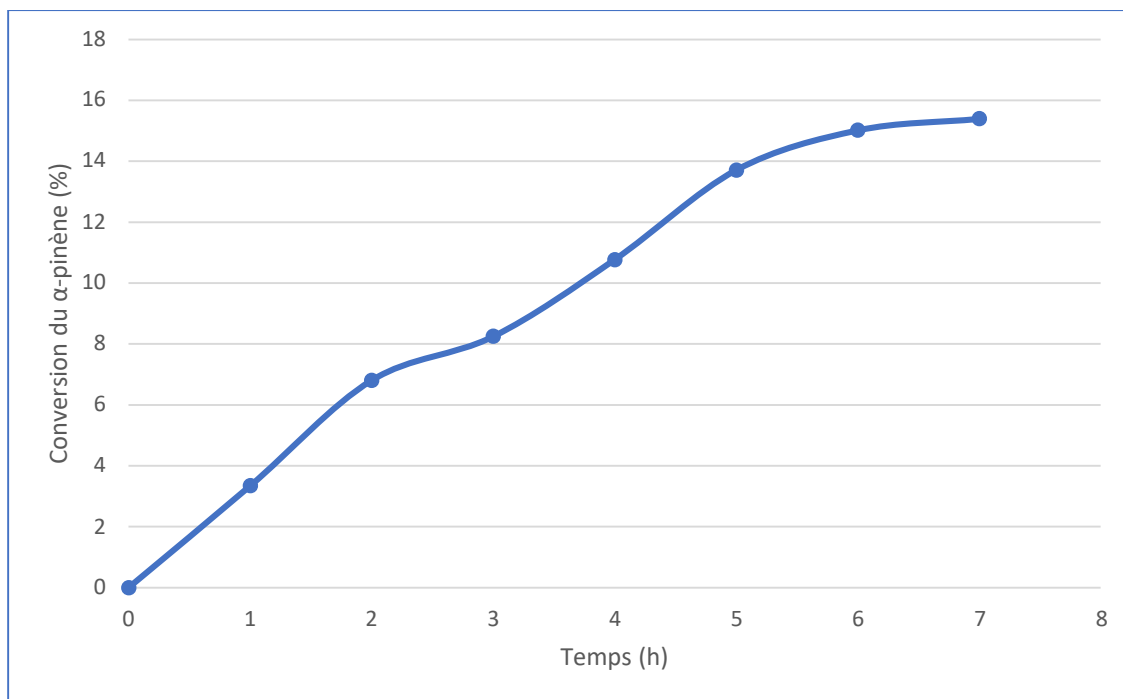


Figure 2.9 Conversion du α-pinène (1) en camphène (3) par les nanotubes de TiO₂ à 100 °C

Après six heures de réaction, la conversion n'était que de 15 %. Ceci est nettement moins que celle rapportée dans la publication de référence soit 77,7 %.⁵³ Puisque l'article mettait l'accent sur l'importance du lavage acide des nanotubes, le lot obtenu de catalyseur a été relavé avec une solution d'acide chlorhydrique diluée. Les neuf grammes restants ont été mélangés avec 250 mL de HCl 0,1 mol/L pendant 1 heure. Le solide a ensuite été filtré et lavé avec de l'eau distillée jusqu'à pH 5. Afin d'obtenir davantage d'informations et de confirmer l'efficacité du lavage, des analyses par rayons X à dispersion d'énergie (EDX) ont été effectuées sur le catalyseur avant et après lavage au HCl. Cette technique permet de quantifier l'abondance élémentaire des éléments présents dans l'échantillon, sans égard à leur environnement ou à leurs degrés d'oxydation. Ceci est obtenu par la configuration électronique unique de chaque élément du tableau périodique, émettant des raies d'énergies précises après excitation et permettant d'identifier les atomes. Un atome d'oxygène sera identifiable qu'il soit présent dans un ion sulfate ou dans une molécule organique. Cependant, dans un mélange de ces deux composés (SO₄²⁻ et un acide organique par exemple), le total massique des oxygènes sera obtenu, sans distinction entre la provenance. L'analyse EDX de l'échantillon de nanotubes avant lavage est présentée à la figure 2.10 :

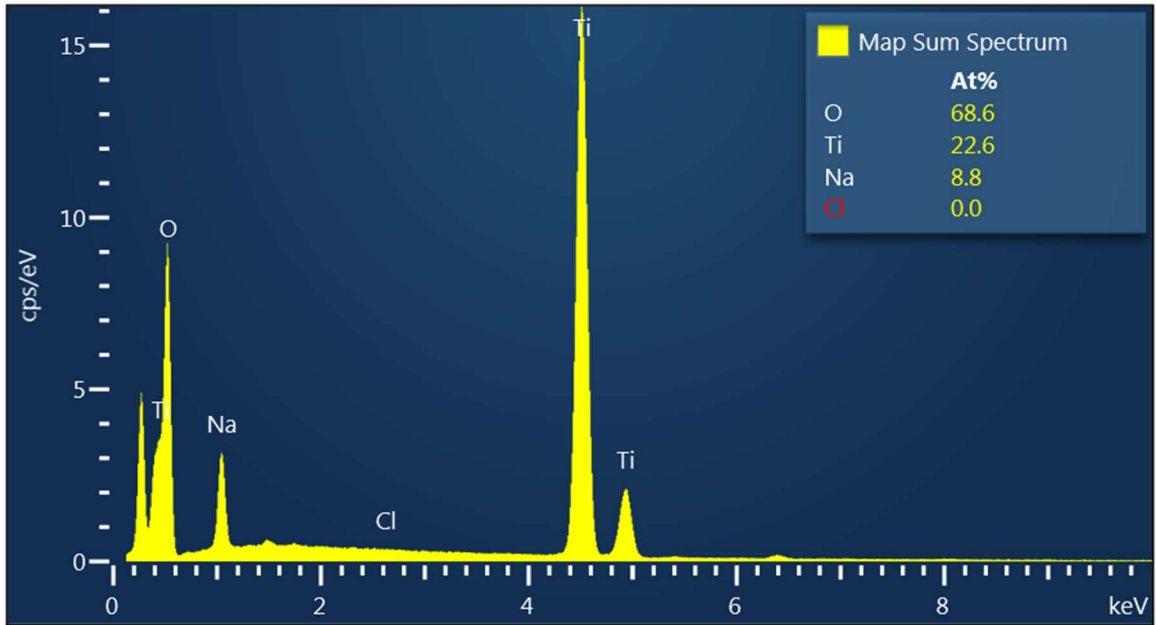


Figure 2.10 Analyse EDX des nanotubes TiO₂ avant lavage

Cet échantillon contient les éléments attendus soit le titane et l'oxygène. En plus, 8,8 % de sodium est observé. La seule source de sodium dans le procédé, outre les possibles contaminants de l'oxyde de titane initial, est l'hydroxyde de sodium utilisé lors de la réaction. Cette présence de sodium indique un lavage insuffisant après la synthèse. Une quantité notable de NaOH est donc trappée à l'intérieur des tubes et devrait être éliminée par lavage acide. L'analyse EDX des tubes après lavage indique que ce dernier a été efficace comme le démontre la figure 2.11 :

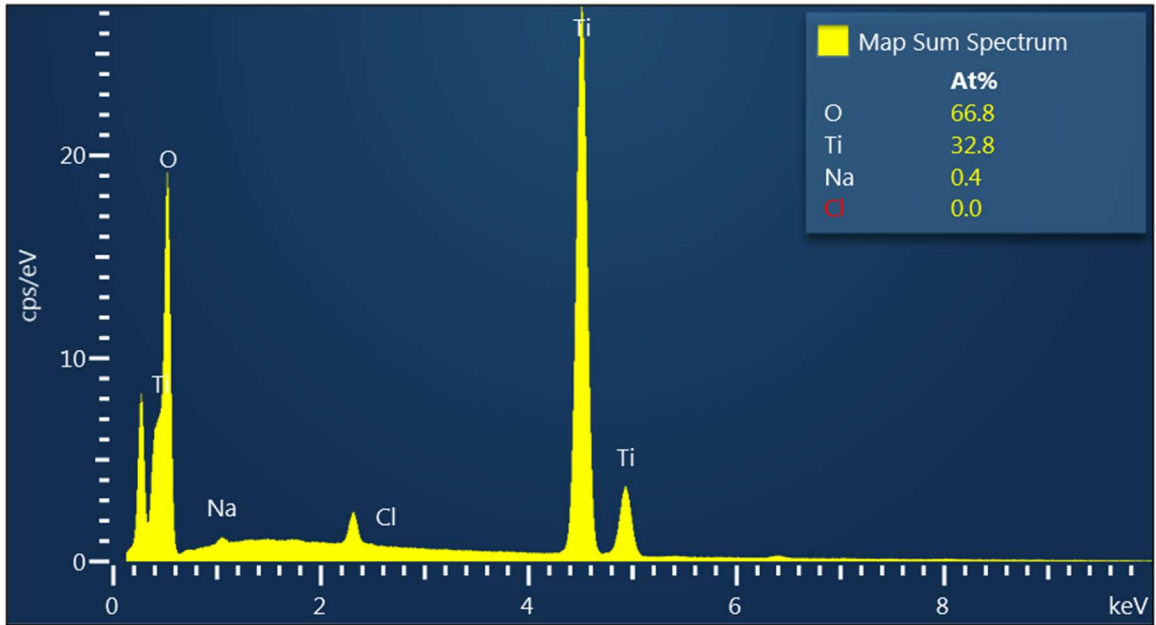


Figure 2.11 Analyse EDX des nanotubes TiO₂ après lavage

Seulement 0,4 % de sodium demeure dans les tubes. Cette valeur est beaucoup plus acceptable. Une image MET a été prise sur cet échantillon lavé afin de s'assurer que les tubes soient toujours intacts, ce qui est confirmé par la figure 2.12 :

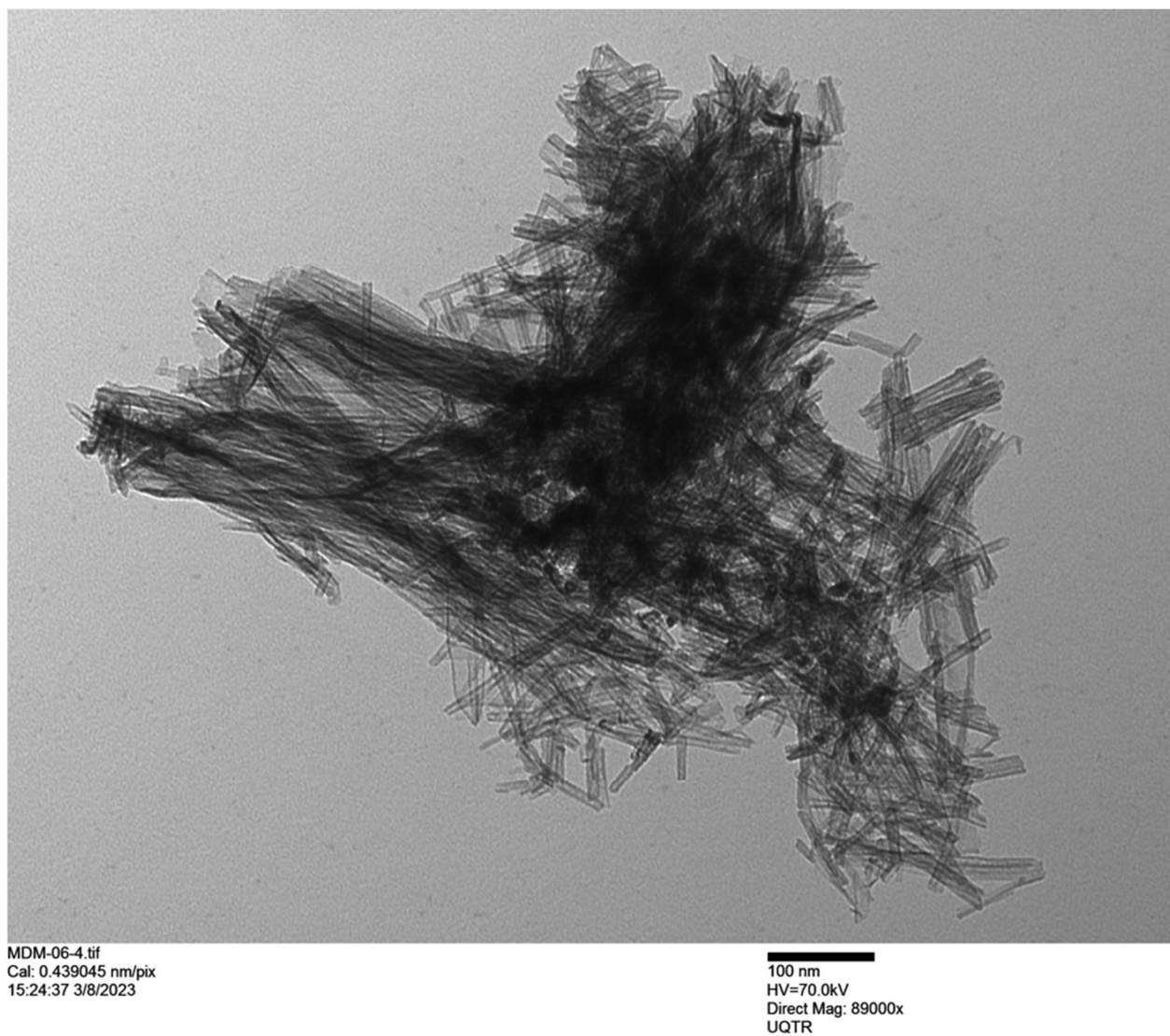


Figure 2.12 Image MET des nanotubes après lavage acide

Les tubes sont en effet toujours présents et aucune dégradation ne semble résulter de ce lavage acide. Ils ont été retestés pour leur activité catalytique selon le même procédé que précédemment et les résultats sont réunis à la figure 2.13 :

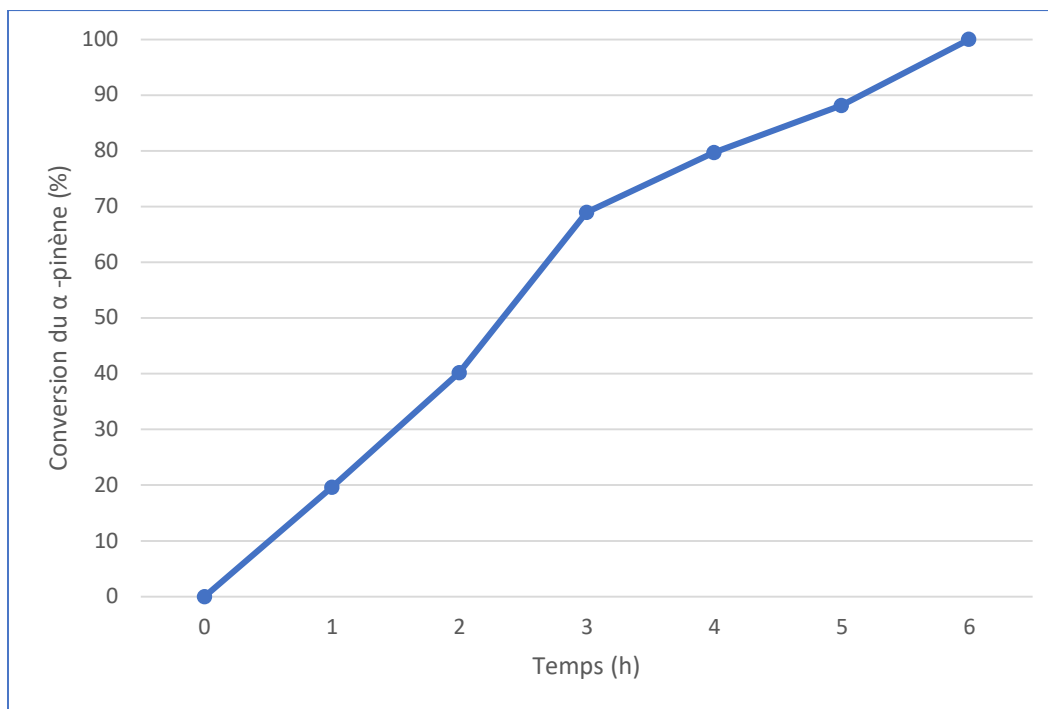


Figure 2.13 Conversion du α -pinène (1) en camphène (3) par Nanotubes TiO_2 relavés avec HCl 0,1 mol/L

Après six heures de réaction, la conversion était complète. Ces données démontrent bien l'importance capitale du lavage acide, agissant comme activation des tubes. Ceci suggère aussi que si les tubes venaient qu'à perdre de leur efficacité au fil du temps, il serait possible de les réactiver en les relavant avec une solution d'acide chlorhydrique avant réutilisation. L'analyse complète du spectre RMN ^1H du camphène (3) est disponible à l'annexe A, entrée 18.

À la suite de ces résultats, des lots additionnels de catalyseur ont été synthétisés et testés pour leur activité catalytique. Ils ont été caractérisés par les mêmes méthodes que précédemment. Sur les lots synthétisés, certains présentaient une faible activité catalytique, et ce, même après un lavage acide vigoureux. Ceux-ci n'ont pas été utilisés pour les essais de ce projet. Seuls les lots similaires ou supérieurs en activité catalytique au premier lot ont été utilisés pour les synthèses. De toute évidence, davantage de travaux sont nécessaires afin de bien maîtriser la confection et l'activation de nanotubes d'oxyde de titane.

Des essais variés ont été effectués notamment quant au lavage des tubes après synthèse. Malgré la recommandation de la publication d'origine qui suggère un lavage HCl 0,1 mol/L, l'activité catalytique de ces lots était très faible. Des lavages multiples à différentes concentrations et les tests d'activités

catalytiques subséquents ont démontré qu'un lavage avec HCl 0,5 mol/L était nécessaire pour obtenir des nanotubes efficaces pour la réaction d'isomérisation. De plus, la température suggérée de 100 °C semblait un peu basse à la lumière des résultats. Il a donc été décidé d'augmenter celle-ci à 120 °C et d'évaluer l'activité catalytique des tubes à cette température. La charge de catalyseur utilisée a été conservée à 5 %. Les résultats étaient prometteurs, avec des conversions de 94 % (Spectre RMN 1H disponible à l'annexe C, section 2.1.1) après seulement deux heures de réaction. Ce sont donc ces conditions qui ont été utilisées pour évaluer l'efficacité des lots de nanotubes pour le reste du projet. À ce stade, suffisamment de nanotubes de TiO₂ avaient été produits à partir de la nanopoudre anatase pour les besoins du projet. Puisque le TiO₂ rutile de grade technique pour la peinture et de granulométrie d'environ 40 µm est moins dispendieux que le TiO₂ anatase en nanopoudre sur les sites consultés (4400 \$/kg contre environ 5 \$/kg), la synthèse des nanotubes a été envisagée à partir de ce grade d'oxyde de titane. La même procédure que pour la nanopoudre anatase a été appliquée pour la confection des nanotubes. Le solide obtenu a été analysé par microscopie électronique à transmission, présenté à la figure 2.14, afin d'évaluer la structure :

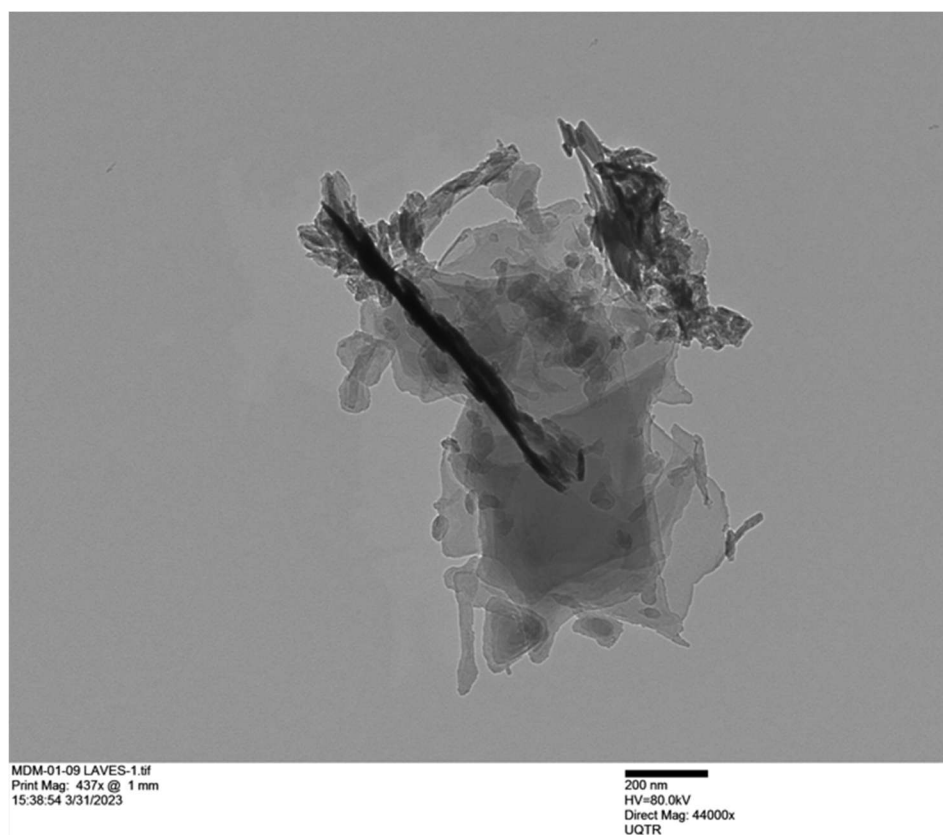


Figure 2.14 Image MET du solide après 24 heures de réaction dans NaOH à 150 °C de la poudre TiO₂ rutile

Après 24 heures de réaction, des nanotubes n'ont pas été observés. En effet, l'échantillon était composé majoritairement de feuillets. Le mécanisme n'ayant pas été étudié en détail, il a été supposé que le feuillet était un état transitoire entre les particules de poudre et les nanotubes. Le feuillet une fois formé se replierait sur lui-même pour former les tubes à l'échelle nanométrique. Un autre essai, celui-ci d'une durée de 48 heures à 150 °C dans une solution de NaOH 10 mol/L a été réalisé. Le lavage a procédé de manière identique aux essais précédents et le solide séché obtenu a été analysé par microscopie électronique à transmission :

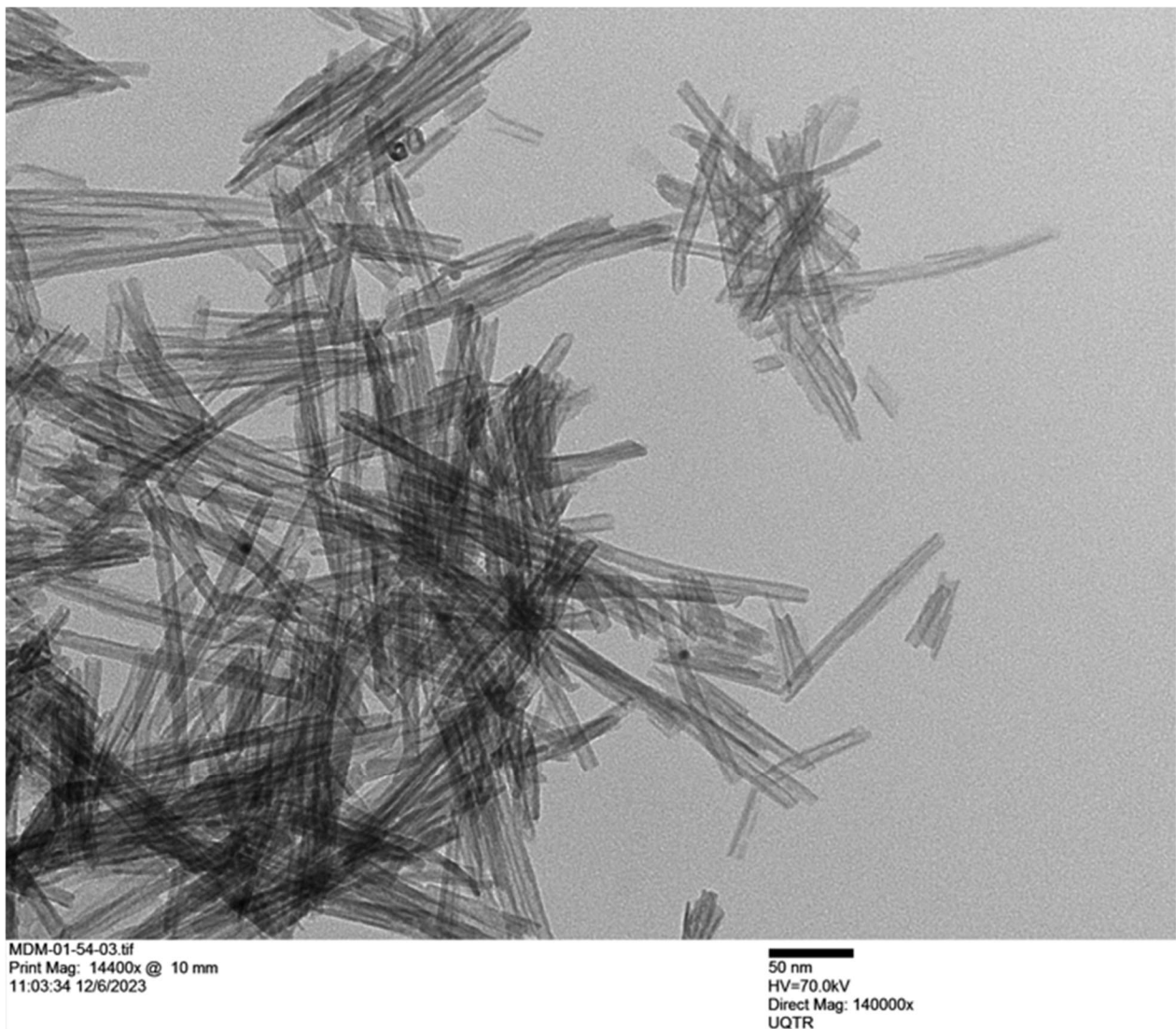


Figure 2.15 Image MET du solide après 48 heures de réaction dans NaOH à 150 °C de la poudre TiO₂ rutile

À la figure 2.15, des nanotubes sont clairement observés et les feuilles sont complètement absentes de l'échantillon. Il est donc logique de supposer que les feuillets sont en effet un état transitoire de la matière lors de cette réaction. Si la poudre TiO_2 rutile venait qu'à être utilisée pour la synthèse commerciale des nanotubes, un temps de réaction suffisant devra être respecté. Ce délai supplémentaire nécessaire peut provenir de la morphologie initiale des particules de TiO_2 (rutile vs anatase) ou encore de la granulométrie supérieure de cet échantillon qui était environ 1600 fois plus élevée que la nanopoudre anatase utilisée précédemment. Ces nanotubes correctement formés ont été testés afin de caractériser leur activité catalytique :

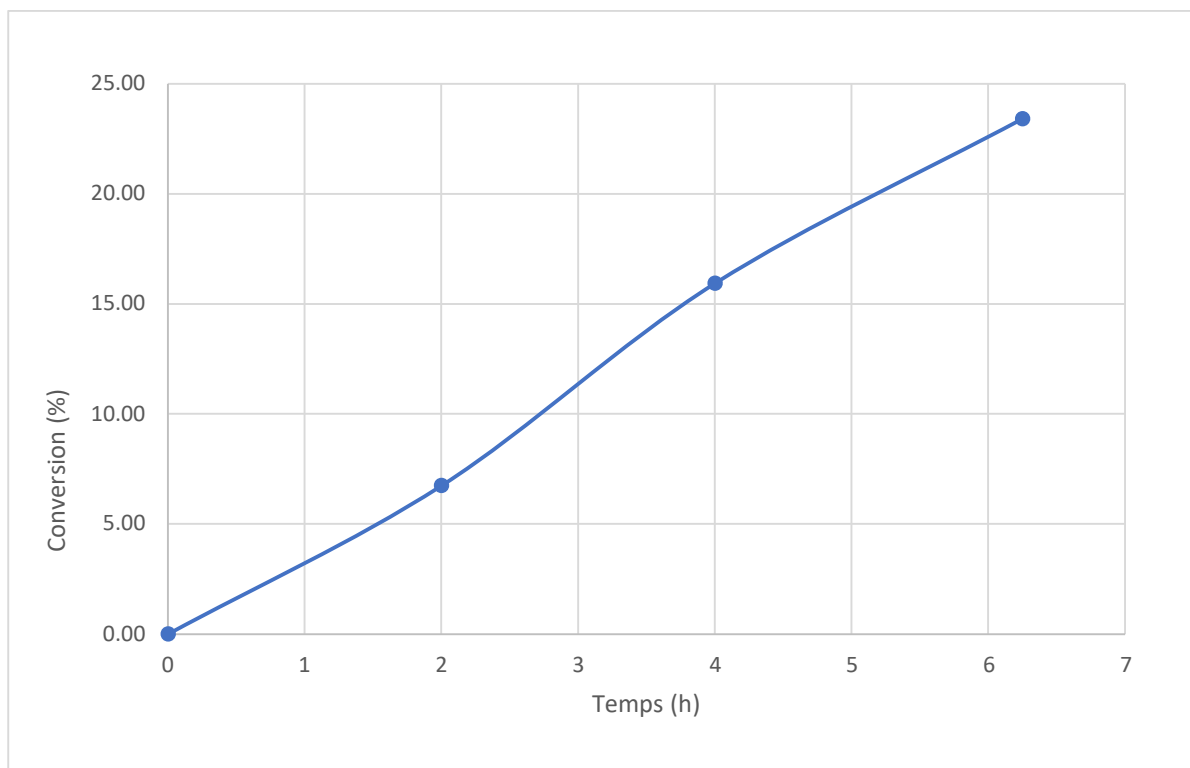


Figure 2.16 Conversion du α -pinène (1) par les nanotubes issus de l'oxyde de titane rutile à 120 °C

La figure 2.16 démontre que les nanotubes confectionnés à partir de l'oxyde de titane de morphologie rutile sont en mesure de catalyser la réaction d'isomérisation du α -pinène (1). Ceux-ci nécessitent toutefois une durée de croissance plus longue lors de la formation des nanotubes et leur activité est plus basse comparativement aux nanotubes issus de la poudre anatase. Ceci démontre qu'il est possible d'obtenir des nanotubes efficaces à partir de deux des morphologies d'oxyde de titane existantes.

Davantage de travaux seraient nécessaires afin d'optimiser la synthèse des nanotubes et conséquemment, leur activité catalytique pour la réaction étudiée.

Davantage d'efforts n'ont pas été déployés sur cet aspect à ce stade du projet. Des lots de catalyseurs efficaces avaient été obtenus et caractérisés et seraient utilisés pour compléter le présent projet. Plusieurs paramètres pourraient toujours être étudiés lors d'un projet futur centré sur les nanotubes. Un contrôle affiné de leur formation, de leurs dimensions et une étude des paramètres régissant leur activité catalytique seraient toutes des informations cruciales à obtenir avant de passer à la phase de production industrielle. De plus, la source idéale d'oxyde de titane tant sur le plan de l'activité des tubes en résultant que des coûts devra être déterminée. Finalement, leur stabilité dans le temps semblait varier lors des essais en laboratoire. Les conditions de stockage et la possible régénération des nanotubes seraient aussi un sujet d'étude pertinent.

Avant de finaliser le choix du catalyseur à étudier quant à la charge catalytique et à la température, des catalyseurs alternatifs se devaient d'être étudiés, ne serait-ce que par souci de rigueur.

2.1.2 Catalyseurs alternatifs

Les catalyseurs alternatifs pour cette réaction d'isomérisation sont nombreux comme l'ont démontré les publications tirées de la littérature.^{50 49 57} Avec les matières premières utilisées pour les nanotubes d'oxyde de titane, certaines options se devaient d'être étudiées. Par exemple, pourquoi confectionner des nanotubes, seulement visibles par microscopie électronique à transmission, si la poudre de TiO₂ initiale catalyse la réaction ? Il était donc impératif d'examiner ces voies de catalyse.

Tout d'abord, les poudres, autant rutile qu'anatase ont été testées dans les conditions d'isomérisation (100 °C, 5 % charge catalytique) afin de convertir le α -pinène (1). Ensuite, l'acide chlorhydrique a été testé seul comme agent catalytique. Enfin, les poudres d'oxyde de titane rutile et anatase ont été traitées avec l'acide chlorhydrique de concentration 0,1 mol/L afin de les activer, de la même façon que le sont les nanotubes. Les résultats sont rassemblés au tableau 2.2 ci-dessous :

Catalyseur	Charge catalytique	Température	Résultat
	(%)	(°C)	
Poudre TiO ₂ rutile traitée avec HCl 0,1 mol/L	s.o.	s.o.	La poudre se solubilise et ne peut être récupérée
Nanopoudre TiO ₂ anatase traitée avec HCl 0,1 mol/L	s.o.	s.o.	La poudre se solubilise et ne peut être récupérée
Acide chlorhydrique	5	100	Aucune conversion après 4 heures
TiO ₂ poudre rutile	5	100	Aucune conversion après 4 heures
TiO ₂ nanopoudre anatase	5	100	Aucune conversion après 4 heures

Tableau 2.2 Résultats d'isomérisation par les catalyseurs alternatifs

Les résultats obtenus sont clairs : les poudres d'oxyde de titane non traitées et l'acide chlorhydrique seule ne catalysent pas la réaction d'isomérisation. De plus, le traitement des poudres par l'acide semble solubiliser, ou du moins défaire les agglomérats de poudre, rendant la récupération impossible. Ces voies alternatives ont été abandonnées compte tenu des résultats prometteurs obtenus précédemment.

Selon la littérature, un autre catalyseur pouvait remplacer ces nanotubes. Encore ici, il s'agissait de traiter une zéolite minérale commune, la clinoptilolite, avec un acide inorganique soit l'acide sulfurique diluée.⁵⁸ Puisque cette réaction proposée semblait plus rapide et plus douce que celle impliquant les nanotubes, il a été suggéré de faire quelques essais avec ce catalyseur. La réaction publiée suggérait des températures de 70 °C pour une conversion complète en quelques minutes, comparativement à quelques heures pour celle utilisant les nanotubes d'oxyde de titane. Le traitement de la clinoptilolite a été réalisé selon la procédure suggérée. La zéolite commerciale a été obtenue par CB Minerals LLC situé à Mamaroneck dans l'état de New York aux États-Unis. La procédure de préparation du catalyseur est disponible à l'annexe A, entrée 17. Le solide obtenu a été mis dans les conditions d'isomérisation soit 70 °C à une charge catalytique de 7,5 g par 100 mL de réactif. Un suivi RMN ¹H a été fait à 2,5, 10, 20, 30, 60 et 130 minutes. Les résultats sont rapportés sous forme graphique à la figure 2.17 :

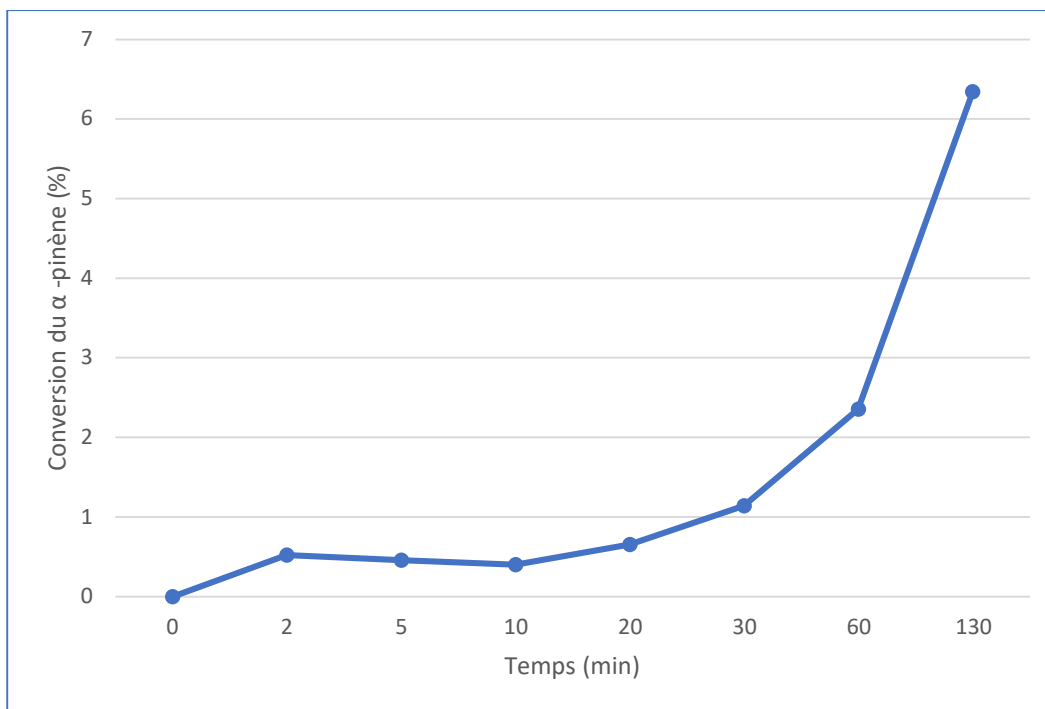


Figure 2.17 Conversion du α -pinène (1) en camphène (3) à 70 °C par Clinoptilolite traitée avec H₂SO₄ 0,1 M

Selon la publication, la réaction aurait dû être complète après seulement quelques minutes. Or, ce n'est pas ce qui a été observé. Même après 130 minutes de réaction dans les mêmes conditions, la conversion n'était que de 6,34 %. Ce catalyseur prometteur a malheureusement été mis de côté pour les besoins du projet. Les conditions d'activation de ce catalyseur pour le rendre plus efficace à catalyser la réaction n'étaient pas bien contrôlées et devraient être davantage étudiées. À en croire la référence, il serait possible de l'optimiser afin d'obtenir une alternative aux nanotubes d'oxyde de titane. Ce travail pourrait être réalisé dans un projet futur.

2.1.3 Isomérisation en lot

Le catalyseur ayant été choisi et suffisamment étudié pour les besoins du projet, la réaction pouvait maintenant être étudiée quant aux conditions usuelles notamment quant à la température et à la charge catalytique. En premier lieu, la charge catalytique a été évaluée. Pour se faire, trois flacons contenant chacun 2 g de α -pinène (1) ont été préparés. Dans chacun, une quantité d'un même lot de nanotubes a été ajoutée. Des charges catalytiques de 2,3 et 5 % (ou 2,3 et 5 g par 100 ml de α -pinène (1)) ont été

choisies pour cette étude. Des masses de catalyseur de 0,04 g, 0,06 g, et 0,1 g ont été ajoutés respectivement dans les flacons. Ceux-ci ont été munis d'un agitateur magnétique et ont été plongés dans un bain d'huile à 120 °C. Des suivis RMN ¹H ont été faits sur les échantillons prélevés sur une durée de quatre heures et les résultats sont disponibles à la figure 2.18 :

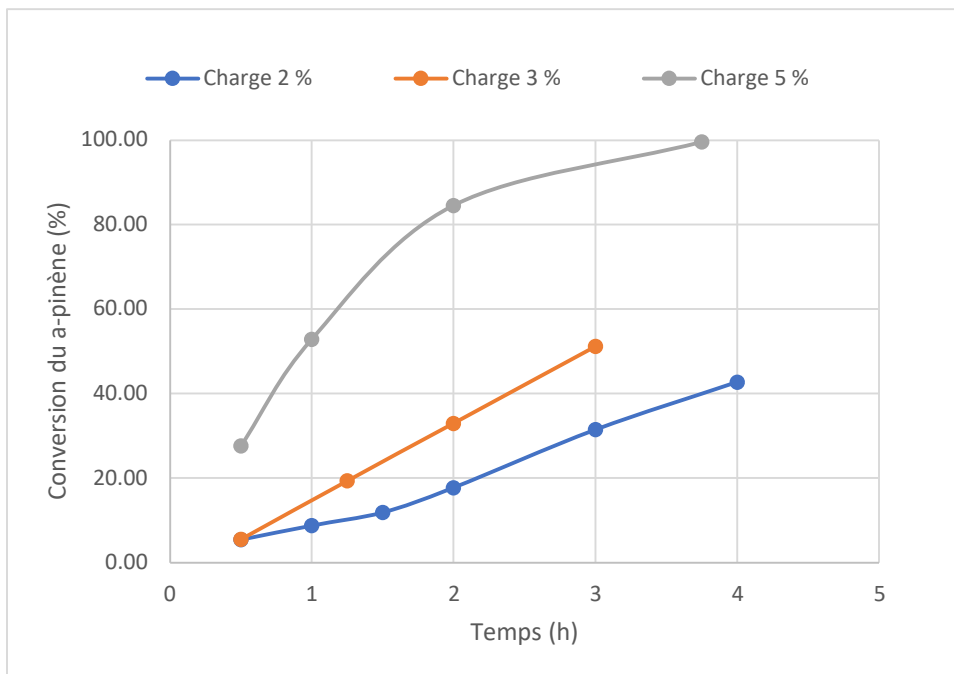


Figure 2.18 Étude de la charge catalytique sur la conversion du α -pinène (1) à 120 °C

L'effet de la charge catalytique est facilement observable. À 2 et 3 % de charge, la conversion est plus lente et n'atteint que 31 % et 51 % respectivement après trois heures de réaction. Comparativement, la réaction à 5 % de charge catalytique atteint plus de 90 % après le même temps. Une charge catalytique supérieure n'a pas été évaluée puisque déjà à 5 % massique, le mélange réactionnel était une suspension épaisse. La charge de 5 % initialement déterminée ne peut être réduite sans une perte considérable de conversion. Cette information est importante si la réaction d'isomérisation finale était réalisée en lot plutôt que par la chimie en flux continu.

À cette étape dans les recherches, la térébenthine a été introduite et étudiée selon les mêmes conditions. L'étude de la charge catalytique, comme précédemment effectuée pour le α -pinène (1) fut la première étape réalisée. Les mêmes conditions de réaction ont été adoptées et le lot de catalyseur était le même que pour le α -pinène (1). Les suivis RMN ¹H ont été réalisés de la même façon afin de construire le la

figure 2.19 rapportant les résultats. Pour la térébenthine, la conversion a été suivie par la disparition du α -pinène (1) en comparaison avec l'apparition de camphène (3) puisque le α -pinène (1) est majoritaire dans la composition de la térébenthine. Le β -pinène (2) a été ignoré pour cette étude :

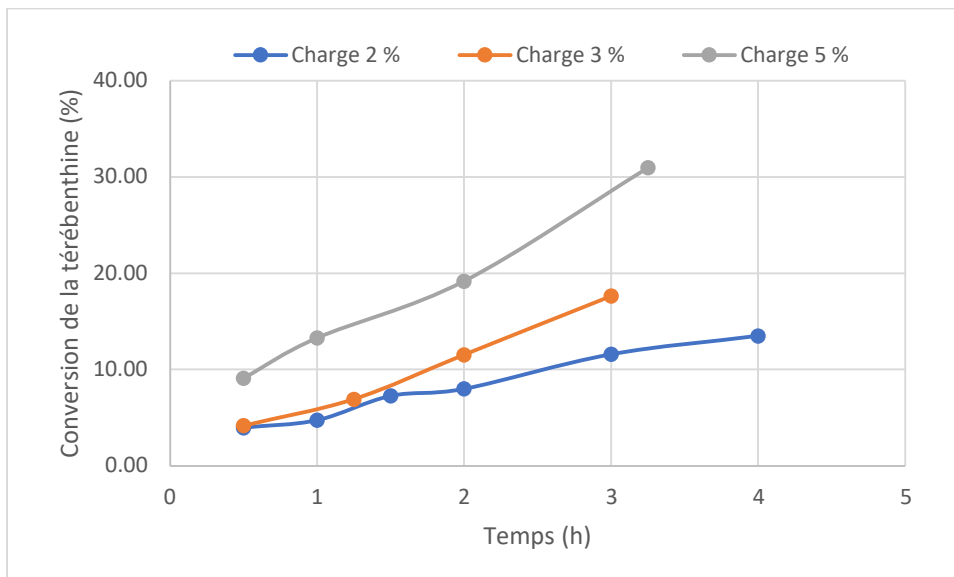


Figure 2.19 Étude de la charge catalytique sur la conversion de la térébenthine à 120 °C

Pour la térébenthine contenant 60 % de α -pinène (1), la charge catalytique est aussi importante, sinon davantage que pour le α -pinène (1) pur. Après trois heures de réaction, les conversions sont de 12 %, 18 % et 28 % à 2 %, 3 % et 5 % de charge catalytique respectivement. Une augmentation de la charge pourrait accélérer la réaction, tout en consommant davantage de catalyseur. Ceci n'est pas un inconvénient puisque dans un système de chimie en continu avec catalyseur solide, la charge catalytique perçue par les molécules est en toute pratique infinie. Ce concept sera expliqué à la section traitant de la chimie en flux continu.

Une observation ressort de cette étude de charge catalytique : la térébenthine réagit beaucoup plus lentement sous les conditions d'isomérisation, à charge égale, que le α -pinène (1) pur. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette observation. Une première hypothèse est que, puisque la térébenthine est un mélange de plusieurs terpènes comme démontré à la section 1.2.2 qui peuvent aussi s'isomériser sous l'effet du catalyseur et de la chaleur, ceux-ci peuvent réagir plus rapidement que le α -pinène (1) et donc occuper les sites réactifs, réduisant ainsi la vitesse de conversion du α -pinène (1) en

camphène (3). L'autre substrat à l'étude pour la réaction d'isomérisation est le β -pinène (2). Lorsque la conversion de ce dernier est tracée en fonction du temps, et superposée à la conversion du α -pinène (1) sur la même durée, la différence est notable :

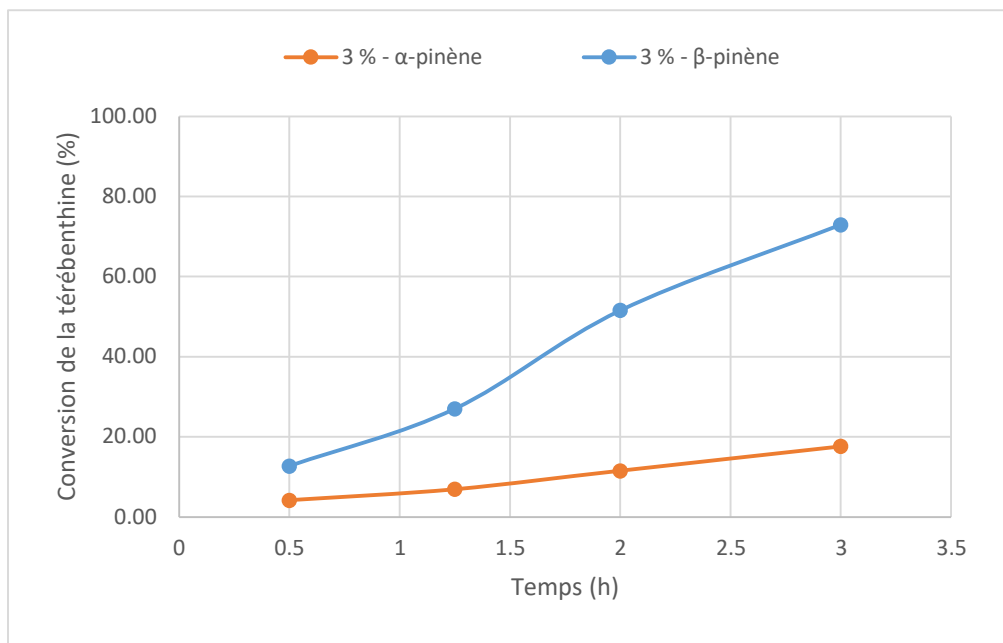


Figure 2.20 Conversions du α -pinène (1) et β -pinène (2) de la térébenthine à 120 °C sous charge catalytique de 3 %

À la figure 2.20, la superposition des courbes de conversion des deux pinènes contenus dans la térébenthine en fonction du temps permet d'observer une grande différence entre les vitesses de réaction. En effet, le β -pinène (2) semble réagir plus rapidement que le α -pinène (1). Ceci peut être dû à sa double liaison qui est en dehors du cycle et donc plus facilement protonée. Si le β -pinène (2) se protone en premier et occupe les sites réactionnels du catalyseur, ceux-ci ne sont plus disponibles pour le α -pinène (1), réduisant ainsi son rythme de conversion en camphène (3). Une autre hypothèse relève de l'empoisonnement du catalyseur par les autres molécules composant la térébenthine. Un peu plus de 7 % de la composition de cette dernière n'a pas été identifiée et ces composés peuvent aussi consommer interagir avec les sites réactionnels du catalyseur. De plus amples essais seraient nécessaires afin de déterminer la cause exacte de cette baisse de réactivité lors du passage du α -pinène (1) à la térébenthine. Cependant, il est clair que sa conversion nécessite une plus grande concentration de catalyseur pour compléter la réaction dans le même délai que le α -pinène (1). Ceci sera considéré lors de la mise en œuvre du système de chimie en continu.

La dernière variable à déterminer était la température à laquelle la réaction d'isomérisation serait réalisée. Cette étude a été menée sur le α -pinène (1) pour fins de simplicité. La charge catalytique a été ajustée à 3 % afin de pouvoir observer les différences. Une réaction trop rapide ne permet pas de bien visualiser l'écart de conversion, c'est pourquoi la charge catalytique a été réduite et conséquemment, la vitesse de la réaction. Les trois flacons contenant le mélange réactionnel ont été plongés dans des bains ajustés à 100 °C, 120 °C et 140 °C. Un suivi RMN ^1H a été effectué afin de caractériser la progression de la réaction et le graphique, présenté à la figure 2.21, a été tracé :

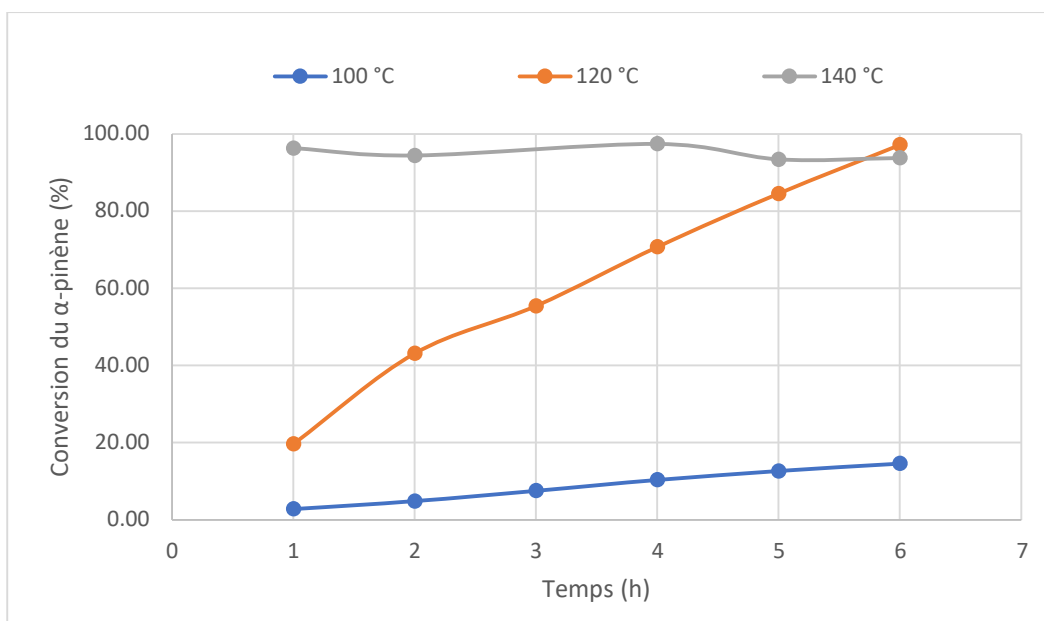


Figure 2.21 Étude de la température sur la conversion du α -pinène (1) à 3 % de charge catalytique

Selon cette étude, une température de 140 °C augmente drastiquement la vitesse de la réaction avec ce lot de catalyseur. Après seulement une heure, la conversion du α -pinène (1) était complète. Cette information sera utile lors de la détermination des conditions de réactions pour les essais en chimie en flux continu. Clairement, 100 °C est insuffisant et la réaction se situe probablement trop bas en température pour surpasser aisément la barrière d'activation. C'est un levier de plus qui sera disponible pour optimiser la réaction d'isomérisation lors de la suite du projet.

2.1.4 Isomérisation en flux continu

La chimie en continu est un concept relativement nouveau en chimie de laboratoire, bien qu'il soit couramment utilisé dans l'industrie. Classiquement, les chimistes sont formés sur le principe de la chimie en lot (ou *batch chemistry* en anglais). Un substrat et un réactif sont mis en contact dans un contenant avec ou sans l'ajout d'un catalyseur. De l'énergie est ensuite fournie à ce mélange soit par la chaleur, l'agitation ou la lumière. Le mélange réactionnel subit la transformation chimique désirée et une fois la réaction complétée, le mélange est purifié et le produit final caractérisé. C'est le concept habituellement enseigné dans les écoles et département de chimie de par le monde. La chimie en continu effectue les mêmes transformations chimiques, mais délaisse le contenant réactionnel usuel pour une tubulure. Les réactifs, substrats et catalyseurs sont injectés et mis en contact dans un réseau de tubes chauffés sous l'effet d'une pression générée par une pompe. Un débit constant est appliqué afin que les réactifs progressent dans les tubes. Un schéma générique d'un montage de chimie en continu peut ressembler à celui présenté à la figure 2.22 : ⁵⁹

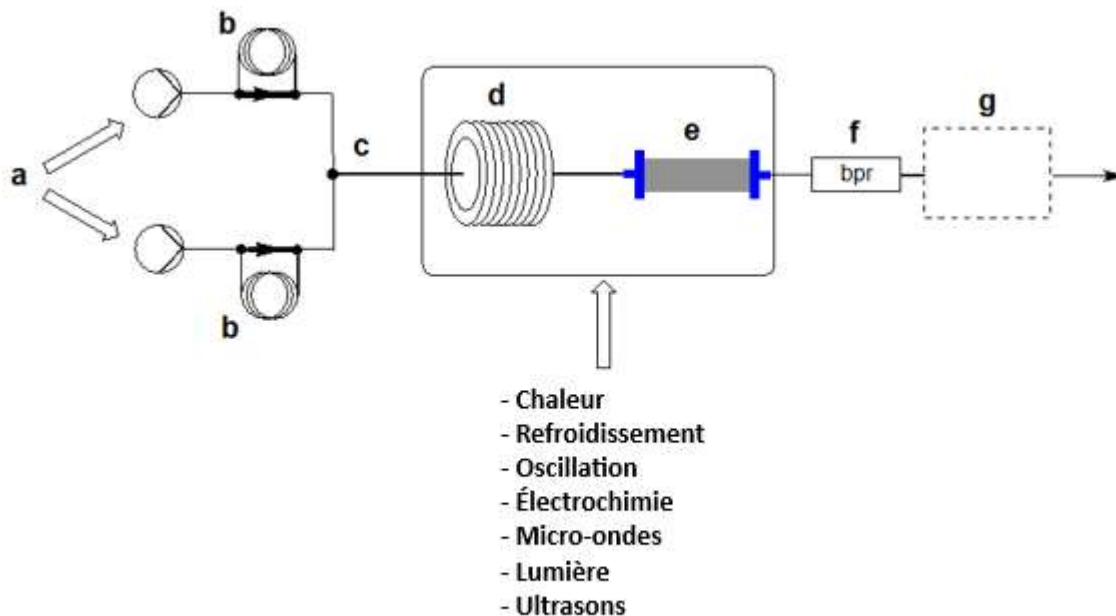


Figure 2.22 Schéma générique d'un montage de chimie en flux continu

Les composantes de ce système sont :

A : Pompes servant à contrôler l'apport en réactifs et solvants

B : Boucles de réaction pour introduire de petits volumes de réactifs

C : Boucle de mélange

D : Réacteur en serpentin

E : Réacteur en colonne

F : Régulateur de contre-pression

G : Analyseur en ligne (FTIR, RMN, Raman, etc.) ou opérations de purification

Ce système peut être modifié selon les besoins de la réaction et peut même être raccordé à un autre système de chimie en flux continu afin d'utiliser le produit d'une réaction comme réactif de la seconde. Les avantages de la chimie en continu sont nombreux. Le système fournit un meilleur contrôle de la température comparativement à un réacteur classique. Un mélange plus efficace y est aussi observé, paramètre souvent sous-estimé lors des réactions en lot. Lors de l'utilisation de substances toxiques, inflammables ou même explosives, les quantités en contact à tout moment sont bien moindres que si la même réaction avait été réalisée en lot. Dans un système de chimie en continu, le produit obtenu à la sortie du système sera toujours identique, tant que les réactifs sont disponibles et que les conditions ne changent pas. Il n'y a pas de variation d'un lot de produit à un autre puisqu'il n'y a effectivement qu'un seul lot unique. Le système peut aussi opérer à une pression beaucoup plus haute qu'un réacteur le pourrait. Des étapes de purification ou de parachèvement de la réaction peuvent être ajoutées dans le procédé comme un refroidissement ou un ajout d'eau ou de solvant pour purifier les produits au fur et à mesure qu'ils sont synthétisés. La vitesse de réaction en un point est grandement augmentée lors de son contact avec le catalyseur. En effet, dans un système comprenant une cartouche chargée d'un solide catalytique, pur ou supporté, le contact entre le substrat et le site catalytique est garanti comparativement à la fréquence de contact lors de l'agitation dans un ballon classique. Enfin, le système pourrait ultimement être contrôlé par une intelligence artificielle qui modifie les paramètres afin d'obtenir une qualité constante du produit fini. ⁶⁰ Un appareil d'analyse soit par spectroscopie ou autre peut même être raccordé à la sortie afin de caractériser le produit final en continu. Pour la mise à l'échelle, il sera beaucoup plus facile d'augmenter le diamètre ou la longueur des tubes afin d'obtenir des productions plus importantes plutôt que d'augmenter la taille d'un réacteur, ce qui peut devenir coûteux ou même dangereux dans un laboratoire. La finalité de ce projet étant la mise à l'échelle industrielle des synthèses

développées, tous ces avantages supportent le choix d'adapter la réaction d'isomérisation à la chimie en flux continu.

Des systèmes de chimie en continu sont disponibles sur le marché tels que ceux de Vapourtech.⁶¹ Ceux-ci sont développés afin d'optimiser le contrôle et la répétabilité des expériences. Ils sont aussi très dispendieux et dû aux limites financières du projet, l'achat de tels systèmes n'était pas possible. Il a donc fallu en développer un qui jumelait un bon contrôle des conditions et une facilité d'utilisation et de modification. Le choix s'est arrêté sur un système de chauffage assuré par un four dans lequel des colonnes remplies du catalyseur solide seraient tempérées. Le tout a été raccordé avec de la tubulure prévue pour les systèmes de chromatographie en phase liquide. Une pompe adaptée à débit variable fournissait la pression nécessaire au déplacement des fluides. La figure 2.23 est une photo composite présentant le système :



Figure 2.23 Système de chimie en continu assemblé

Les composantes de ce système sont :

A : Réservoir de mélange réactionnel

B : Pompe à débit variable en ml/min

C : Four à contrôle digital

D : Colonnes de catalyseur submergées dans des billes d'aluminium

E : Refroidissement

F : Récolte du mélange réactionnel

G : Enregistreur de données

Canal 1 : Température de la colonne 1

Canal 2 : Température de la colonne 2

Canal 3 : Température du four

Dans ce système, le mélange réactionnel est injecté par la pompe à travers les colonnes chauffées contenant le catalyseur solide. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi et récolté dans un contenant. L'enregistreur de données permet d'observer en temps réel la température aux abords des colonnes et dans le four. Ce système a été développé à l'issue de plusieurs essais et visait à fournir un bon contrôle de la température. En ce sens, les colonnes ont été recouvertes de billes d'aluminium afin de créer une masse thermique amenuisant les fluctuations de température. Les colonnes choisies contenant le catalyseur étaient des colonnes pour la chromatographie en phase liquide ne contenant aucune garniture. Ces colonnes, similaires à celles présentées à la figure 2.24, font 15 et 25 cm de longueur et ont un diamètre de 4,6 mm. Ces données permettent de calculer les volumes vides des colonnes. Les volumes calculés sont de $2,5 \text{ cm}^3$ et $4,2 \text{ cm}^3$ respectivement. Un centimètre cube étant égal à un millilitre, les volumes sont facilement convertissables. Ces volumes seront utiles lors du calcul des temps de réaction. La quantité de catalyseur insérée dans les cartouches totalisait $2,0 \pm 0,1 \text{ g}$.



Figure 2.24 Colonnes HPLC contenant le catalyseur

Dans la chimie en continu avec catalyseur solide, le temps de réaction correspond au temps de contact du mélange réactionnel avec le catalyseur solide contenu dans les cartouches, de son entrée dans le système à sa sortie. Ce temps de contact est appelé « temps de résidence » et peut être calculé à l'aide de certaines données. Lorsqu'un procédé est transféré d'un système à un autre, c'est ce paramètre qui doit demeurer constant, et ce sans regard à l'échelle. Premièrement, le volume des cartouches vides (calculé ci-haut) est nécessaire. Ensuite, le volume effectif, soit le volume libre restant après le remplissage des cartouches avec le catalyseur solide doit être mesuré. Finalement, le débit d'injection du liquide régissant sa progression au travers du catalyseur solide peut être obtenu directement de la configuration de la pompe qui donne une valeur en millilitre par minute. La division du volume libre par le débit donnera le temps de résidence en minute selon l'équation suivante :

$$\text{Temps de résidence (min)} = \frac{\text{Volume effectif (mL)}}{\text{Débit (mL/min)}} \quad (2)$$

Pour calculer ce temps de résidence, il manque le volume effectif, qui découle du volume vide des colonnes. Pour la colonne de 15 cm par exemple, son volume vide est de 2,49 mL. Pour calculer son volume effectif (ou volume libre) lorsque remplie de catalyseur solide, en l'occurrence les nanotubes d'oxyde de titane, il faut déterminer le pourcentage de volume disponible dans un volume connu de nanotubes. Pour se faire, un volume connu de nanotubes a été délicatement entassé dans un cylindre gradué. Dans ce volume de nanotubes entassés, du α -pinène (1) a été ajouté jusqu'à recouvrir les nanotubes. Le volume de α -pinène (1) ajouté a été noté et le ratio de volume libre a été calculé selon l'équation :

$$\text{Volume libre (\%)} = \frac{\text{Volume } \alpha\text{-pinène ajouté (mL)}}{\text{Volume de nanotubes (mL)}} \quad (3)$$

Les nanotubes possédant une grande porosité, ce qui leur confère un grand nombre de sites réactifs et donc une grande réactivité, le ratio attendu était très haut. L'essai en laboratoire, pour un volume de 10 mL de nanotubes, a nécessité 8,8 mL de α -pinène (1) afin de recouvrir le solide avec le liquide, représentant un volume libre de 88 %. En d'autres mots, 88 % du volume de nanotubes entassés est composé d'interstices dans lesquels le mélange réactionnel peut progresser et réagir. Ceci est conséquent avec les valeurs de la littérature qui évaluent à environ 90 % le volume libre disponible dans des nanotubes entassés.^{62 63} La méthode recommandée pour évaluer cette valeur est habituellement l'adsorption de gaz.

⁶⁴ N'ayant pas accès facilement à la méthode, l'approximation réalisée était suffisante pour les besoins du projet. Ce serait cependant une analyse à réaliser si un projet portant sur le catalyseur était enclenché. Cette valeur doit d'ailleurs être calculée pour chaque type de catalyseur puisqu'elle varie selon sa nature. Dans les colonnes de catalyseur de volume 2,5 mL et 4,2 mL, c'est donc dire que les volumes effectifs seront de 2,2 mL et 3,7 mL dans les colonnes de 15 cm et 25 cm respectivement. Le total de ces volumes effectifs (~5,9 mL) représente le volume du système, dans le cas où le volume de la tubulure est négligé. Le temps de résidence peut maintenant être calculé pour différents débits de la pompe utilisée :

Débit (mL/min)	Temps de résidence (min)
0,1	59,0
0,2	29,5
0,5	11,7
1	5,9
2	2,9
3	2,0
5	1,2
10	0,6

Tableau 2.3 Temps de résidence en fonction du débit pour les nanotubes de TiO₂

Comme le démontre le tableau 2.3, le temps de résidence est inversement proportionnel au débit. Le temps maximal est de 59,0 minutes et est dû au débit minimal de la pompe de 0,1 mL/min. À l'autre bout de l'échelle, le temps de résidence minimal étudié est de 0,6 minute pour un débit de 10 mL/min. Il aurait été possible de le réduire davantage, mais un temps de réaction plus court n'a aucun avantage concret.

Pour les essais en continu, le débit sera varié, du plus court au plus long, et un échantillon sera récolté après le temps de résidence, considérant que le système est à son état stable. L'état de stabilité (*Steady state* en anglais) est le temps nécessaire pour que le système soit constant et que les variations soient éliminées. Classiquement, ce temps correspond à trois fois (3x) le temps de résidence. Plus court et le système n'a pas atteint sa stabilité. Plus long et des matières premières sont gaspillées. Pour chaque débit et temps de résidence, trois temps de résidence devront être écoulés avant que l'échantillon ne soit prélevé. Par exemple, au débit le plus rapide soit 10 mL/min, le temps de résidence est de 0,59 minute. Une fois la pompe ajustée à 10 mL/min, il faudra attendre 1,8 min (0,6 min X 3) avant que le système soit

considéré comme stable. Une fois l'échantillon prélevé, le débit de la pompe sera réduit à 5 mL/min pour amener le système aux prochaines conditions et éviter les contaminations entre les échantillons. Ensuite, 3,5 min devront s'écouler avant que le prochain échantillon ne puisse être récolté. Le même processus sera appliqué aux débits en ordre décroissant. Ceci assure que l'échantillon récolté a réellement eu le temps de résidence programmé et pour éviter les contaminations d'une gamme de conditions à une autre. La conversion en pourcentage sera calculée par RMN ^1H en suivant les signaux caractéristiques des molécules comme précédemment. Cette conversion sera ensuite mise en graphique en fonction du temps de résidence de manière homologue à une réaction classique par temps de réaction.

Pour les essais en lot, la température idéale de l'isomérisation du α -pinène (1) avait été fixée à 140 °C. Dans les essais en continu, la température a été variée au cours de trois expériences afin de confirmer ce choix. Des températures de 100 °C, 120 °C et 140 °C ont été testées, et ce à huit temps de résidence par température. Le même lot de nanotubes a été utilisé pour les trois essais afin d'éviter toute variation provenant du catalyseur. Pour fin de simplicité, le α -pinène (1) commercial a été premièrement utilisé. L'essai à 100 °C a été le premier essai réalisé et les résultats sont disponibles à la figure 2.25 :

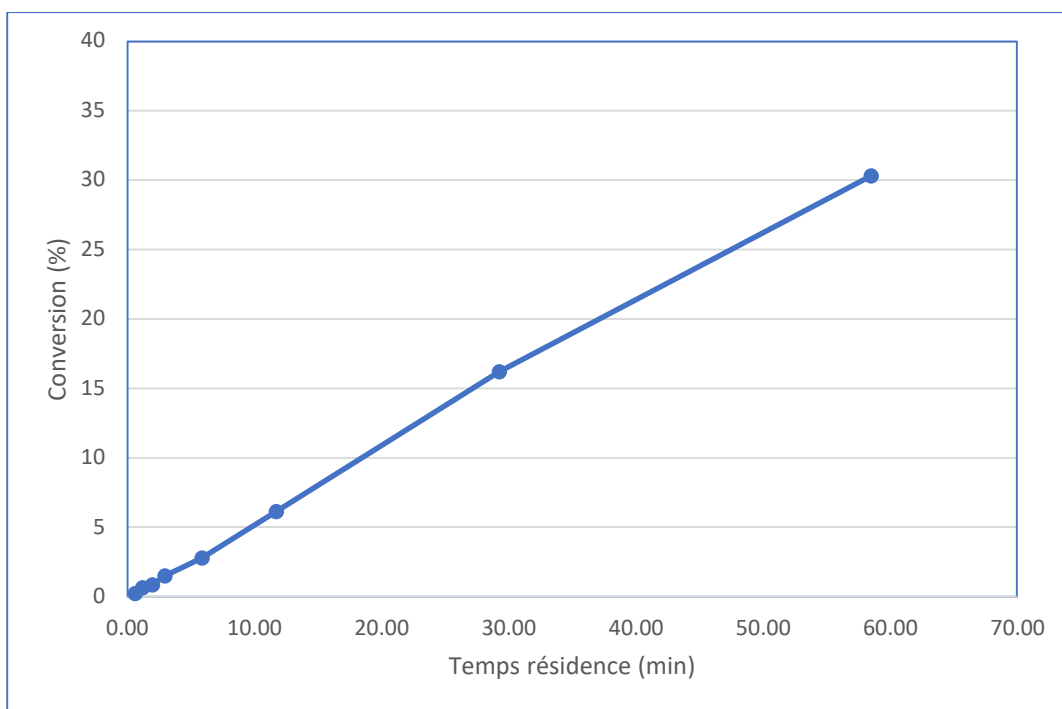


Figure 2.25 Conversion du α -pinène (1) en camphène (3) avec nanotubes TiO_2 à 100 °C par la chimie en continu

Au temps de résidence maximal, la conversion du α -pinène (1) n'est que de 30,31 %. Ceci n'est clairement pas suffisant et par limitations du système, il était impossible d'augmenter le temps de résidence. La température a donc été augmentée à 120 °C lors d'un autre essai par la chimie en continu. Les cartouches ont été vidées, nettoyées et ensuite remplies de catalyseur neuf du même lot que l'essai à 100 °C. Les résultats de la réaction menée à 120 °C sur le α -pinène (1) sont ensuite tabulés à la figure 2.26 :

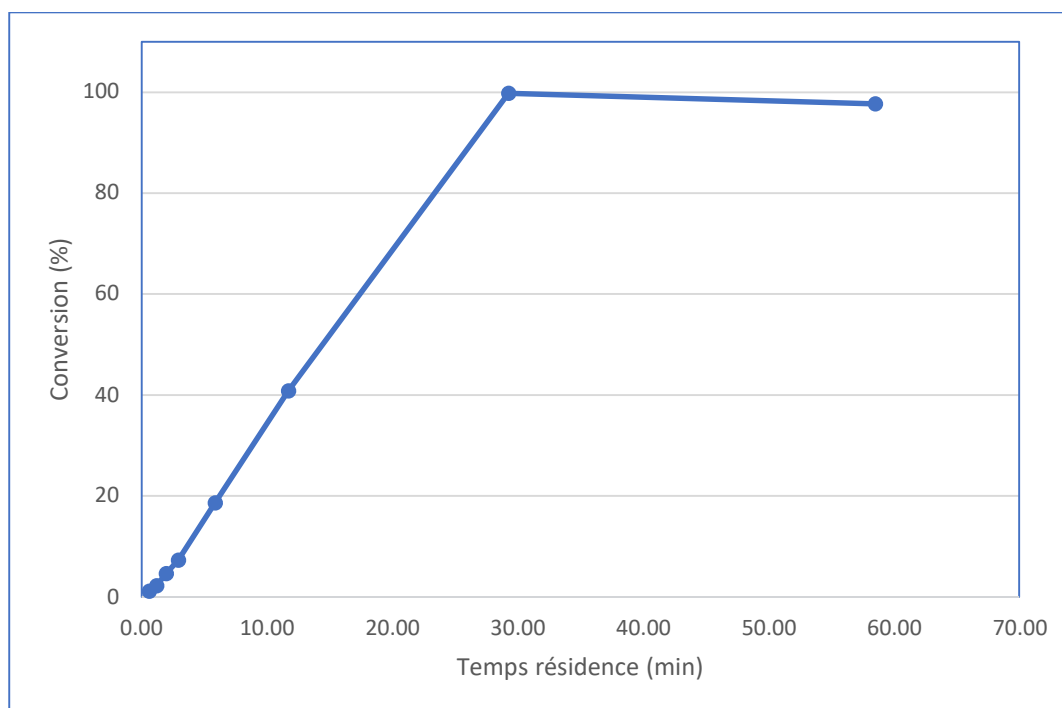


Figure 2.26 Conversion du α -pinène (1) en camphène (3) avec nanotubes TiO_2 à 120 °C par la chimie en continu

À un temps de résidence de 30 minutes, la réaction semble complète. Celui-ci correspond à un débit de 0,2 mL/min. Si une température de 120 °C était choisie, ce temps de résidence serait le meilleur compromis entre complétion de la réaction et le débit. Bien que le temps de résidence pourrait être augmenté afin de s'assurer de la complétion de la réaction, un débit plus grand permet une plus grande production au fil du temps. La dernière température de 140 °C a été appliquée au système et les résultats des échantillons analysés sont recueillis à la figure 2.27 :

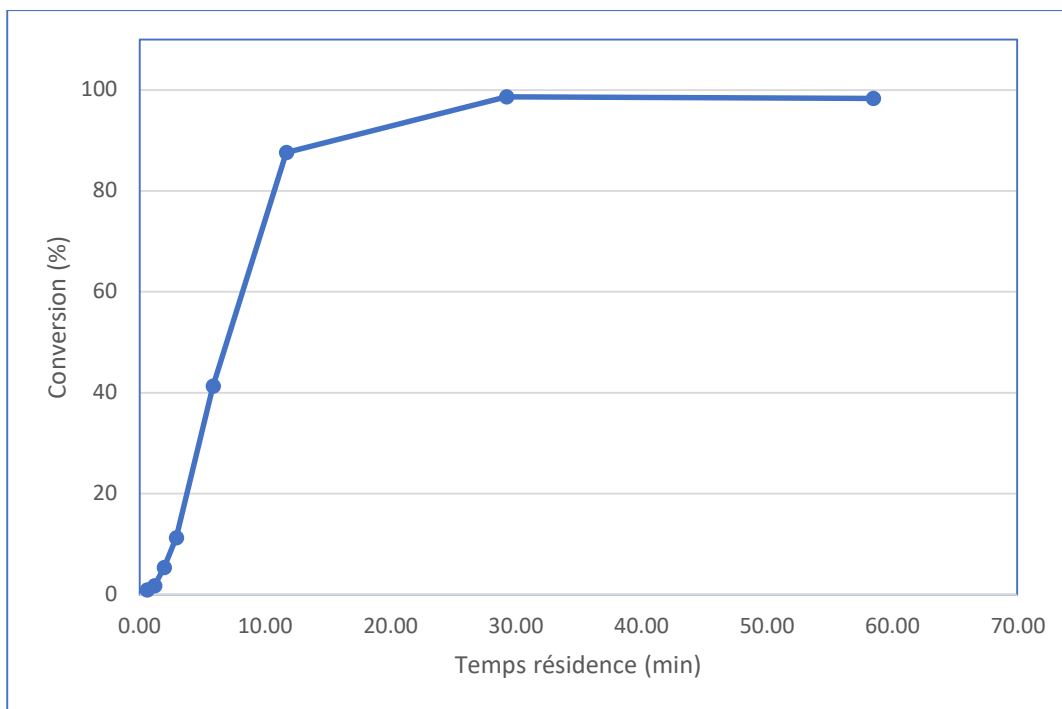


Figure 2.27 Conversion du α -pinène (1) en camphène (3) avec nanotubes TiO_2 à 140 °C par la chimie en continu

La réaction à 140 °C progresse plus rapidement qu'à 120 °C, et ce sans surprise. Un temps de résidence de 20 minutes aboutit en une complétion d'environ 90 % selon le graphique. Le débit supérieur permet une production plus rapide, ce qui est avantageux dans un contexte industriel. En conclusion, la température choisie pour la production de camphène (3) à partir du α -pinène (1) était de 140 °C.

La prochaine étape consistait à appliquer ces conditions à la térébenthine désodorisée précédemment. Les conditions étaient identiques à l'essai à 140 °C et les mêmes suivis, dont les résultats sont regroupés à la figure 2.28, ont été réalisés :

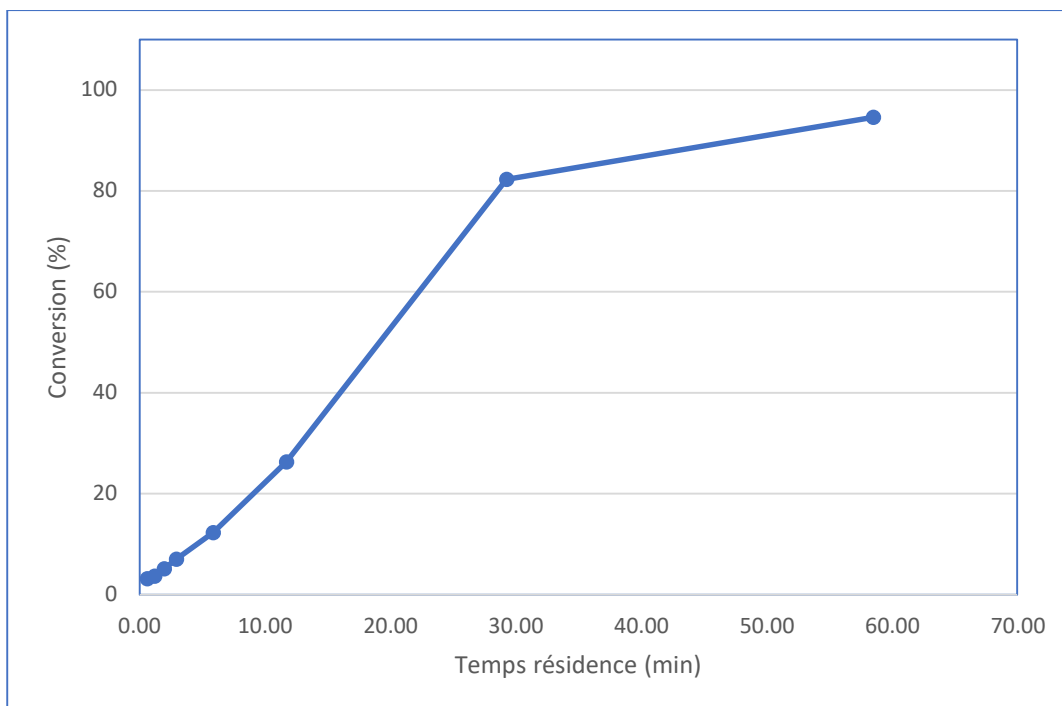


Figure 2.28 Conversion de la térébenthine en camphène (3) avec nanotubes TiO_2 à 140 °C par la chimie en continu

La conversion de la térébenthine progresse plus lentement que la conversion du α -pinène (1) pur comme il a été déterminé à la section 2.1.3. À 59,0 minutes de temps de résidence, la conversion n'est toujours pas complète, mais avoisine les 95 %. La dernière étape de ce volet était de produire une quantité de camphène (3) à partir de la térébenthine pour pouvoir travailler sur la purification. Ceci a été fait à débit constant et à 140 °C. À un débit de 0,1 ml/min ou un temps de résidence de 59,0 minutes, une production de quelques centaines de millilitres s'étalait sur plusieurs jours. Le système a été stabilisé et la conversion était suivie quelques fois par jour. Le graphique obtenu a été construit avec la conversion du α -pinène (1) au camphène (3) en ordonnée et la masse de térébenthine traitée, calculée avec le temps écoulé multiplié par le débit et multiplié par la densité de la térébenthine de 0,85 g/mL en abscisse. Ceci permettait d'observer la désactivation du catalyseur comme le démontre la figure 2.29 :

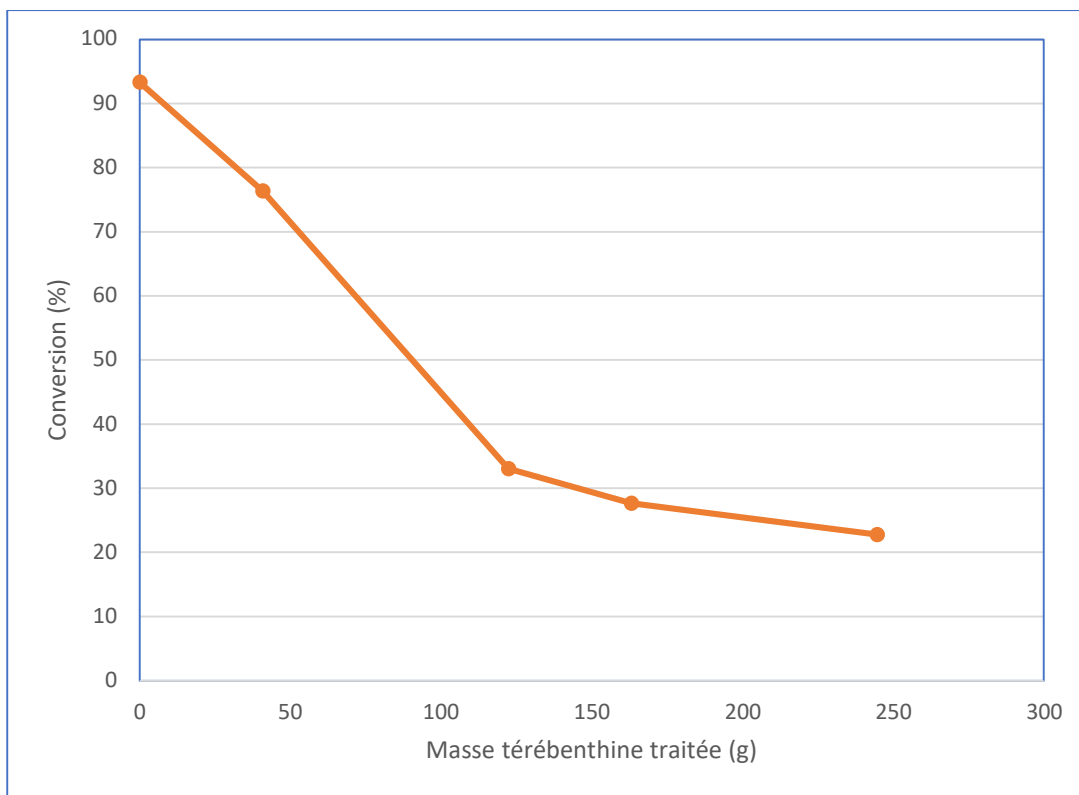


Figure 2.29 Conversion de la térébenthine en camphène (3) - Chimie en continu à 140 °C sous un débit de 0.1 mL/min

Le point d'inflexion correspond au temps nécessaire pour l'empoisonnement ou la désactivation des nanotubes d'oxyde de titane par la térébenthine ou ses contaminants. Le point d'inflexion survient très rapidement, avant 50 g de térébenthine traitée, ce qui indique qu'une grande quantité de catalyseur est nécessaire afin de catalyser efficacement la réaction. Après 250 g de térébenthine traitée, l'expérience a été stoppée et le volume de térébenthine traité a été complété en lot avec une charge catalytique de 5 % à 140 °C pour les besoins du projet. Après complétion de la réaction, ce lot de térébenthine isomérisée en camphène (3) a été filtré pour éliminer le catalyseur. La purification pouvait maintenant être réalisée sur ce lot. À titre indicatif, ce lot a été analysé par la méthode GC-FID développée afin de déterminer la teneur en camphène (3). Le chromatogramme est présenté à la figure 2.30 :

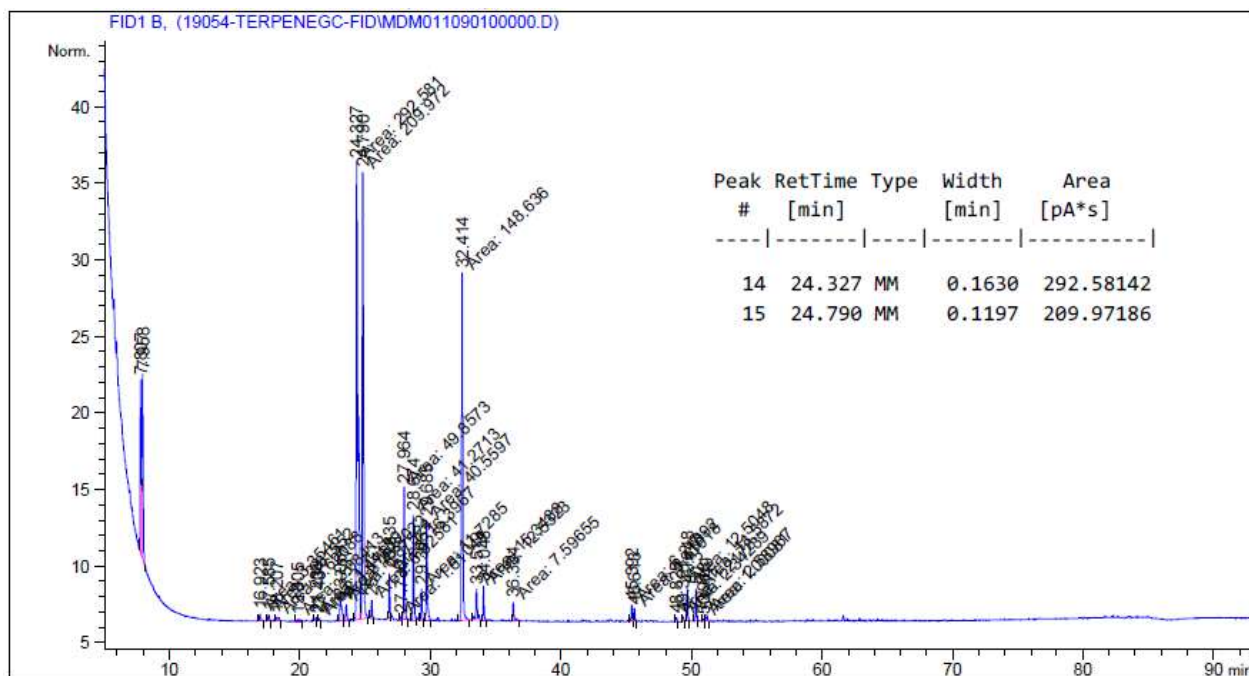


Figure 2.30 Chromatogramme GC-FID chiral de la térébenthine isomérisée

Ce chromatogramme de la térébenthine isomérisée permet de calculer la teneur en camphène (3) dans le mélange réactionnel après isomérisation. En ramenant l'aire des deux énantiomères du camphène (3) (à 24,327 min et à 24,790 min) sur le total des aires intégrées, une pureté de 54 % est obtenue, représente par la même occasion le rendement de la réaction. L'isomérisation de la térébenthine crée de multiples molécules dont le limonène (8) et d'autres terpènes. À la suite d'une purification cependant, le camphène (3) sera récupéré avant d'être utilisé comme réactif pour l'estérification.

2.1.5 Purification du camphène (3) synthétisé

La purification est une étape cruciale et comme le produit de cette synthèse était voué à être le réactif de la réaction subséquente, il était impératif d'obtenir un camphène (3) le plus pur possible afin d'éviter les sous-réactions. Une méthode de séparation de liquides en continu est la distillation. Celle-ci peut être effectuée sur un système de distillation sur film essuyé (*Wiped film distillation* de l'anglais) en industrie. Ce système peut être fourni et évacué en continu, permettant la purification de grandes quantités de produits nécessitant peu d'interventions humaines. Une distillation classique serait effectuée au

laboratoire puisque des systèmes de ce type à petite échelle sont plutôt rares ou demandent des quantités largement supérieures à ce qui avait été produit à ce jour par l'équipe de projet. Les conditions déterminées peuvent ensuite être transposées à un système en continu par une équipe d'ingénierie. La distillation a été mise en place et a été suivie. Plusieurs fractions ont été obtenues et séparées pour éviter la contamination entre les distillats. À la suite des analyses RMN ^1H , elles ont été combinées selon les résultats. Si la fraction était majoritairement composée de camphène (3), elle a été sélectionnée et combinée avec les autres fractions similaires. La superposition des spectres RMN ^1H d'une fraction typiquement acceptée et du camphène (3) est présentée à la figure 2.31 :

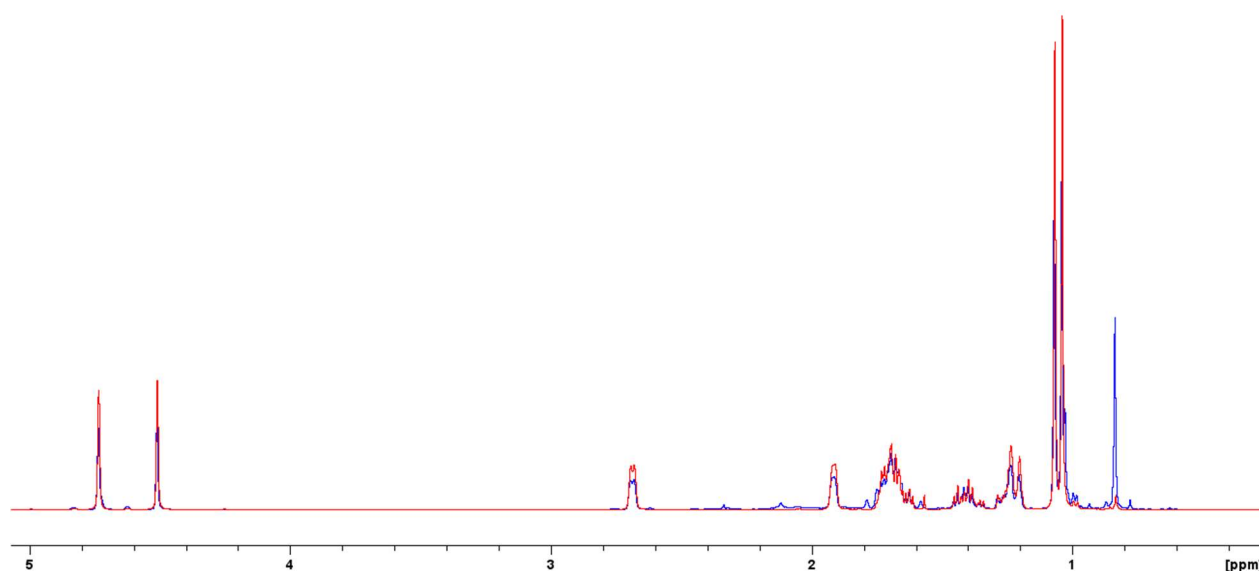


Figure 2.31 Spectre RMN ^1H du camphène (3) (rouge) et d'une fraction considérée comme acceptable

Cette fraction a ensuite été analysée par GC-FID chirale pour obtenir sa pureté. Le chromatogramme est disponible à la figure 2.32 suivante :

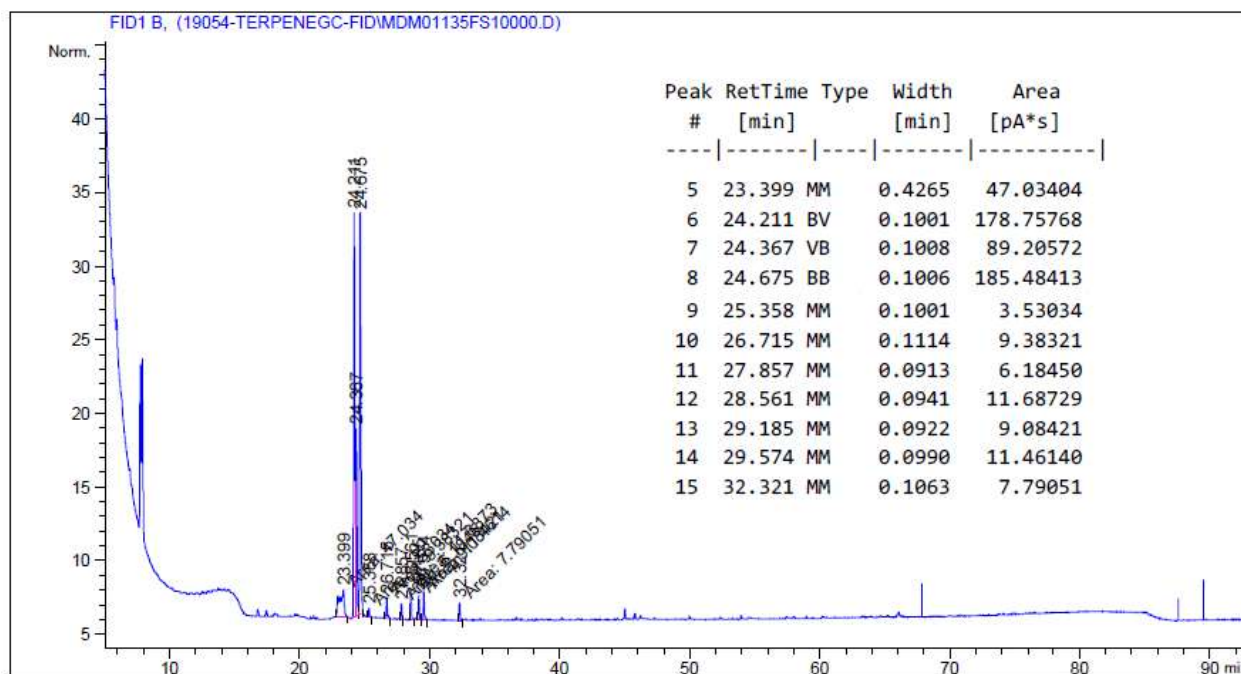


Figure 2.32 Chromatogramme d’une fraction de distillation majoritaire en camphène (3)

La pureté en camphène (3) calculée à partir du chromatogramme ci-dessus est de 65,09 %. Les autres molécules sont potentiellement des terpènes dont par exemple le limonène (8). Ce dernier est un produit largement disponible sur le marché et suivant une recherche de partenaires industriels, il serait possible de le revendre afin de valoriser les sous-produits de cette réaction dans un contexte industriel.

Le rendement brut récupéré est de 55 % si les masses des fractions acceptables sont additionnées et rapportées sur la masse totale de mélange purifié. En comparaison, le rendement théorique selon la pureté du mélange réactionnel par GC-FID obtenue plus haut est de 65,09 %. Les fractions non sélectionnées contenaient tout de même du camphène (3). Si les conditions de purification étaient ajustées, ce rendement théorique pourrait être pratiquement atteint. L’objectif n’était pas d’optimiser le rendement, mais de démontrer que la distillation est une voie viable de purification pour cette réaction d’isomérisation.

La réaction d’isomérisation était ici suffisamment étudiée et l’étude de la réaction d’estérification était la prochaine étape dans le procédé.

2.2 Estérfication du camphène (3)

La seconde réaction à l'étude était l'estérfication du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4). Cette réaction procède par le réarrangement de Wagner-Meerwein.⁶⁵ Un groupement alcool ou ester dans le cas présent peut être généré sous la forme d'eau ou d'un acide respectivement. Cette réaction est connue et le mécanisme proposé est présenté à la figure 2.33 :⁶⁶

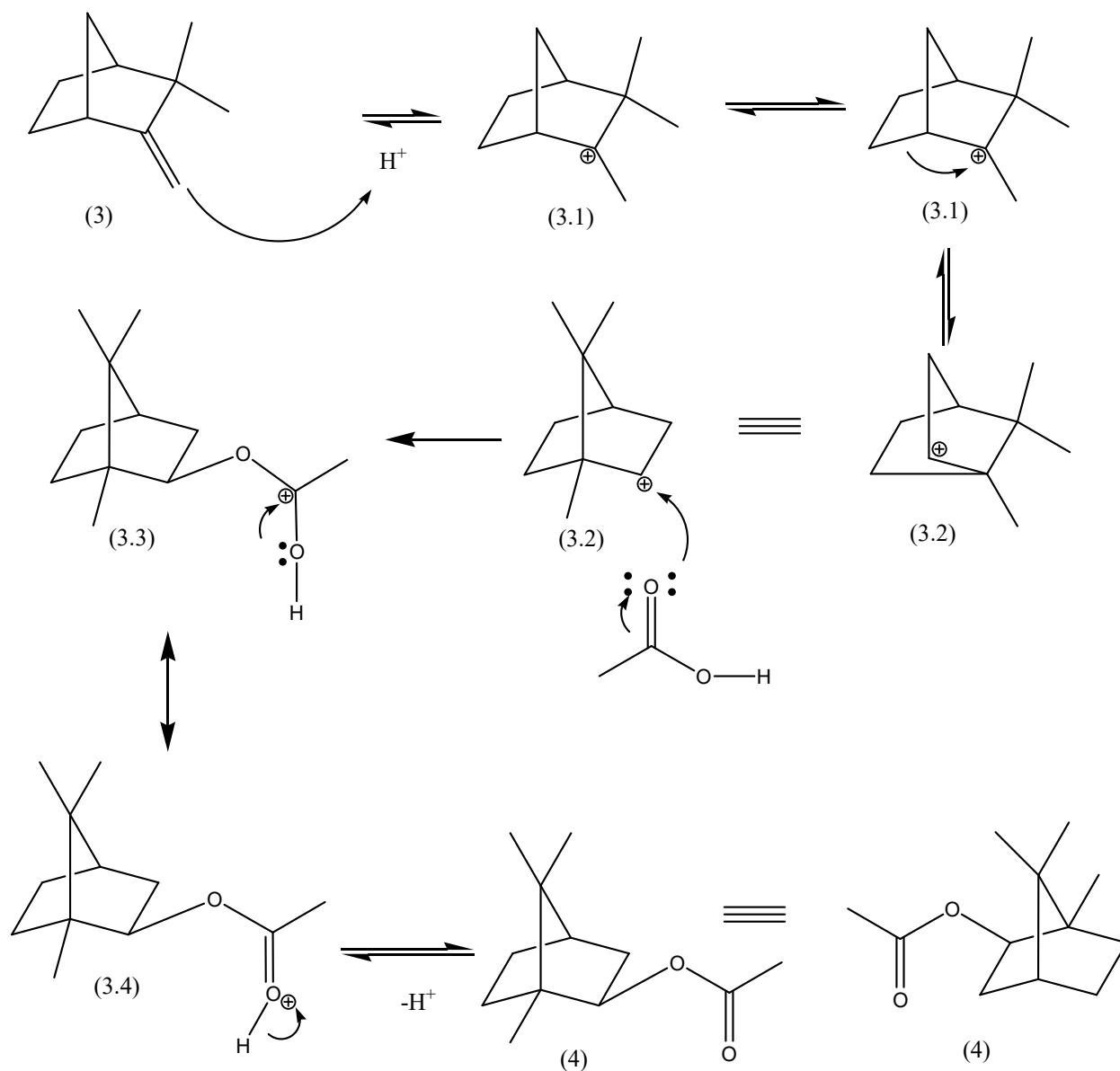


Figure 2.33 Mécanisme de l'estérfication du camphène (3) catalysée par un acide de Brønsted

Ce mécanisme peut être résumé par la protonation du double lien du camphène (3.1) suivie de la migration du carbocation entraînant une migration d'un lien C-C (3.2), suivi de l'attaque de l'acide acétique sur le carbocation (3.3) et la déprotonation (3.4) pour produire l'acétate d'isobornyle (4). Dans le but de réduire les réactions non désirées, le camphène (3) commercial sera utilisé. Si la réaction résultait en de l'acétate de bornyle (5) plutôt que l'acétate d'isobornyle (4), la différence sera visible sur les spectres RMN du proton.

Le catalyseur choisi pour cette réaction est le catalyseur acide supporté sur matrice polymérique « *Amberlyst 15 Dry* ». ^{67 68} Ce catalyseur est composé d'une matrice macroporeuse de copolymère styrène-divinylbenzène. Les groupes fonctionnels sont des acides sulfoniques, ce qui leur confère une forte réactivité en tant qu'acide de Brønsted. Recommandé pour les condensations, les éthérifications et les estérifications, ce catalyseur solide est tout à fait approprié pour la réaction à l'étude. Il possède une grande surface spécifique de 53 m²/g avec des pores de diamètre moyen de 300 Å. La grosseur des particules n'est pas spécifiquement indiquée dans la fiche du fabricant, mais un distributeur, Sigma-Aldrich en l'occurrence, indique que les particules mesurent entre 355 et 1180 µm. ⁶⁹ Reconnue pour gonfler en présence de solvant, c'est un paramètre dont il faudra tenir compte lors du calcul de la porosité et du temps de résidence de ces billes de résine. La dernière donnée importante est la température maximale d'utilisation qui ici est fixée à 120 °C. Idéalement, il ne faudra pas excéder cette température lors de l'estérification, sinon la résine risque de se dégrader.

D'autres catalyseurs existent pour cette réaction dont l'acide sulfurique, les catalyseurs supportés sur silice et les zéolites. ^{70 71 72} Cependant, les résines polymériques ont l'avantage de pouvoir être régénérées de multiples fois, ne produisent pas ou peu de rejets nécessitant une neutralisation, ne corrodent pas les équipements métalliques en usine et les billes de résine sont suffisamment volumineuses pour pouvoir être immobilisées dans une cartouche à l'aide d'une grille.

2.2.1 Estérification en lot

L'estérification utilisant le catalyseur commercial acide Amberlyst 15, il n'y avait pas de confection de catalyseur à réaliser contrairement à l'isomérisation. La réaction a donc été étudiée directement pour déterminer les paramètres à appliquer lors de la synthèse par la chimie en flux continu.

La synthèse sélectionnée implique l'addition du groupement acétate au camphène (3) protoné par la résine acide. Ce groupement acétate provient de l'acide acétique, réactif de synthèse couramment utilisé en chimie organique et peu dispendieux. Les équivalents nécessaires à une complétion de la réaction ont tout d'abord été déterminés. Pour se faire, cinq flacons contenant 1 eq de camphène (3) ont été préparés. Une charge catalytique de 10 % de la résine acide Amberlyst 15 a été ajoutée. Finalement, différents équivalents d'acide acétique ont été ajoutés dans chaque réaction. Des valeurs de 1, 1,2, 1,5, 2 et 5 équivalents d'acide ont été sélectionnées. Idéalement, moins grande est la quantité d'acide ajouté, plus rentable sera un procédé puisqu'il utilisera un plus petit excès de réactif. Les mélanges réactionnels ont été agités à température ambiante pendant 48 heures et un échantillon a été prélevé après ce délai. L'analyse a procédé par RMN ^1H en ciblant les signaux caractéristiques comme déterminé à la section 1.1.3. La description complète du spectre RMN ^1H de l'acétate d'isobornyle (4) est disponible à l'annexe A, entrée 20. L'analyse RMN de l'échantillon contenant un seul équivalent d'acide acétique est présentée à la figure 2.34 :

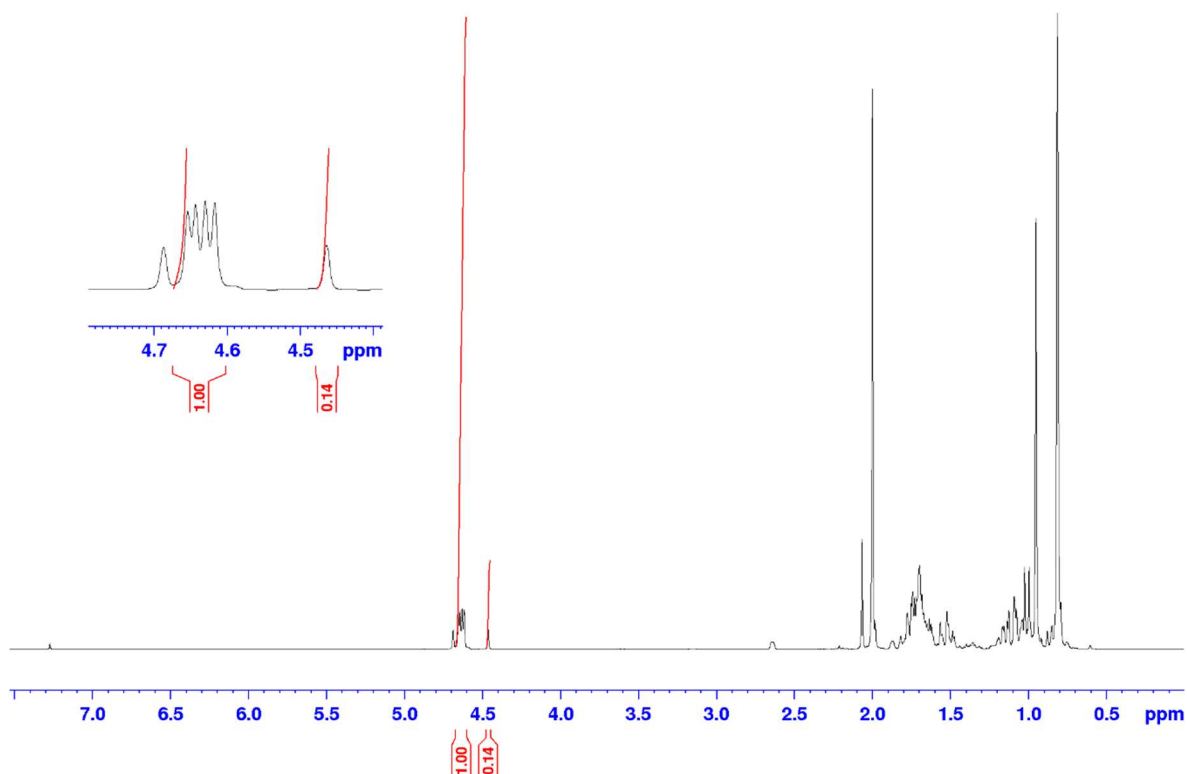


Figure 2.34 Spectre RMN ^1H du mélange à 1,0 équivalent d'acide acétique après 48 h à température ambiante

La conversion a été déterminée en divisant la valeur d'intégration du signal de l'acétate d'isobornyle (4) à 4,65 ppm toujours fixée à 1,00, par le total des intégrations des produits et réactifs qui est ici de 1,14. Ramenée en pourcentage, la conversion calculée est de 87,7 %. La même analyse a été appliquée aux autres échantillons et une courbe a été construite. Afin d'évaluer la variable de la température par la même occasion, une autre série de mélanges réactionnels ont été préparés de la même façon. Cependant, ils ont été plongés dans un bain d'huile ajusté à 50 °C durant une nuit ou environ 18 heures. Les valeurs de conversion ont été ajoutées au graphique de la figure 2.35 :

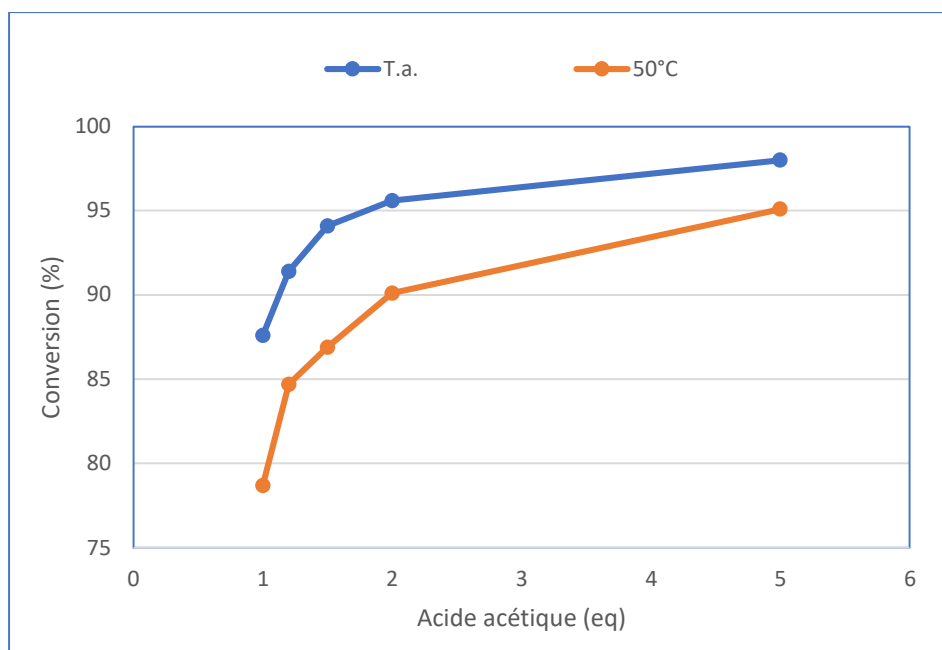
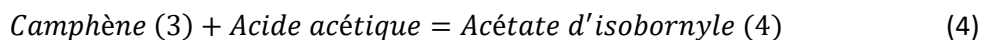


Figure 2.35 Estérification du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec différents équivalents d'acide acétique

Les courbes des conversions à T.a et à 50 °C ont réunies dans un même graphique afin de les comparer. Une observation notable est que la conversion est moins grande à 50 °C pour les mêmes équivalents qu'à T.a. Ceci est inhabituel puisque dans la majorité des cas, une réaction progressera plus rapidement lorsque davantage d'énergie est fournie. Suivant le principe de Le Chatelier, il est noté aussi que les équivalents d'acide acétique doivent être au-delà de 1,5 afin d'obtenir une complétion appréciable de la réaction. Moins de 1,5 équivalent et la conversion diminue drastiquement. Le gain d'avancement de la réaction entre 2 et 5 équivalents est toutefois négligeable et ne justifie pas l'utilisation d'un excès de 4 équivalents. Les valeurs de 1,5 et 2 équivalents seront les conditions explorées lors de l'adaptation de la réaction à la chimie en continu.

L'abaissement de la température résultant en une complétion plus haute a été étudié surtout lors de la chimie en flux continu puisqu'il était facile d'appliquer différentes températures. Les informations tirées de ces essais sont ici utilisées pour tenter d'expliquer ce phénomène.

L'équation équilibrée de la réaction chimique à l'étude est :



Une des équations impliquant la température et permettant d'expliquer les observations est l'énergie libre de Gibbs. Cette équation définit l'énergie de Gibbs à une température donnée : ⁷³

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

Où

ΔG = Variation de l'énergie libre de Gibbs

ΔH = Variation d'enthalpie

T = Température (°K)

ΔS = Variation d'entropie

Cette équation permet potentiellement d'expliquer le phénomène observé où une réduction de la température favorise l'équilibre vers les produits et non vers les réactifs. Il est à noter ici que le terme ΔS est négatif dû au passage de 2 moles de réactifs à 1 mole de produit pour la réaction directe, réduisant l'entropie du système. La variation de l'énergie de Gibbs doit être négative ($\Delta G < 0$) pour que la réaction directe, vers les produits, soit favorisée. Ceci signifie que puisque la réaction se produit à 20 °C comme à 50 °C, le terme ΔG est toujours négatif. Cependant, la valeur de ΔG fluctue selon la température. Selon l'exemple à 1,5 équivalent d'acide acétique de la figure 2.35 à 50 °C, cette valeur est faiblement négative par exemple et la réaction bloque à environ 87 % de complétion. Et à 20 °C, la valeur de ΔG est plus fortement négative, ce qui déplace l'équilibre vers les produits et propulse la complétion à 94 %. La comparaison suivante met en équation les observations :

$$\Delta G(20\text{ }^{\circ}\text{C}) < \Delta G(50\text{ }^{\circ}\text{C}) \quad (6)$$

Les informations dérivées de la figure 2.35 démontrent que l'application d'une température plus douce, lorsque la complétion de la réaction stagne, permet de pousser l'équilibre vers les produits. C'est une information à conserver lors du développement du système de chimie en continu pour cette réaction. Un système à deux températures ou à température variable serait avantageux, contrairement au système développé pour l'isomérisation du α -pinène (1).

Avant de procéder aux essais en continu, une dernière vérification s'avérait nécessaire. Les deux réactions fonctionnant sur un mécanisme débutant par une protonation, les deux catalyseurs utilisés étaient-ils nécessaires ou était-il possible de réaliser les deux réactions à l'aide d'un seul de ces catalyseurs ? C'est ce que l'expérience suivante visait à déterminer. Pour obtenir cette information, trois flacons ont été préparés. Chacun contenait 10 g de α -pinène (1) et 9,66 g (2 eq) d'acide acétique glacial. À ces mélanges ont été ajoutées trois charges catalytiques des catalyseurs utilisés jusqu'à présent selon le tableau 2.4 :

Essai	Nanotubes TiO ₂	Amberlyst 15
	(%)	(%)
1	5	0
2	0	5
3	3	3

Tableau 2.4 Charges catalytiques des essais pour la voie de synthèse directe

Ces trois mélanges ont été chauffés selon le même programme de température. Trois périodes de deux heures chacune à des températures différentes ont été réalisées. Le mélange était chauffé à 60 °C, puis à 110 °C et finalement à 145 °C. Le temps de chauffe (temps requis pour atteindre la température requise) ici a été négligé, bien qu'il soit non nul. Des échantillons ont été prélevés après chaque période de deux heures à la température prescrite et des suivis par RMN ¹H ont été faits. La conversion du α -pinène (1) en acétate d'isobornyle (4), sur les bases des intégrations caractéristiques semblait prometteuse comme le démontre la figure 2.36 :

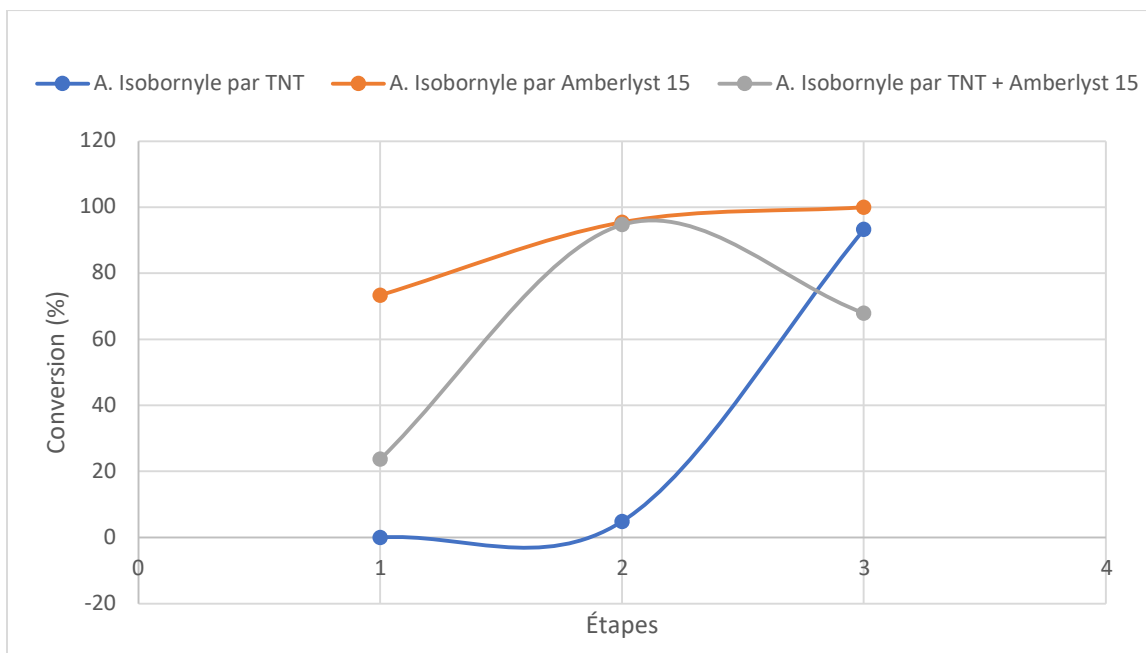


Figure 2.36 Conversion du α -pinène (1) en acétate d'isobornyle (4) par voie directe

Ces conversions à elles seules auraient pu induire en erreur. En effet, lorsque le spectre RMN ^1H présenté à la figure 2.37 est analysé en entier, il est évident que la conversion présentée ci-haut n'est pas représentative de la réalité :

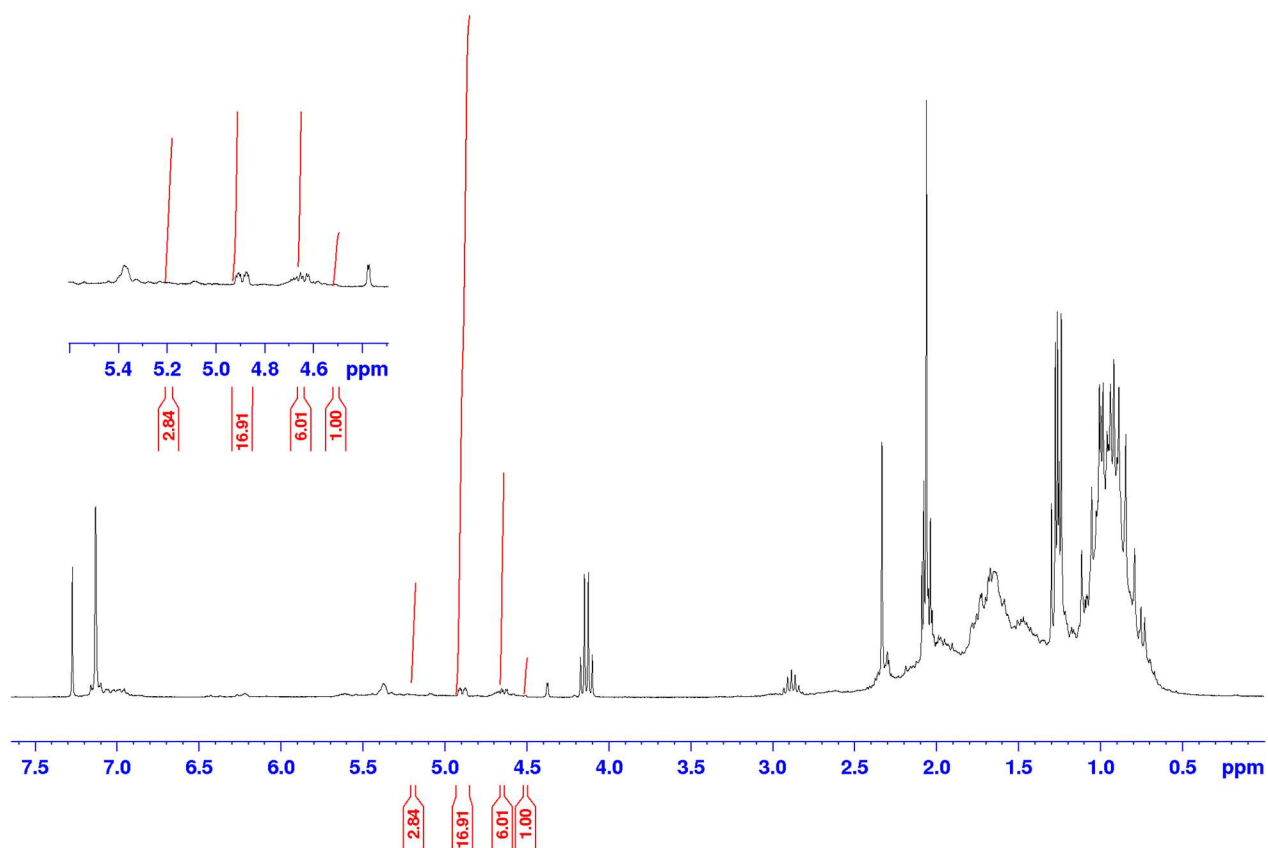


Figure 2.37 Spectre RMN ¹H de la conversion du α -pinène (1) avec les catalyseurs d'isomérisation et d'estérification combinés

Ce spectre RMN de la réaction avec les nanotubes de TiO₂ et la résine Amberlyst 15 (Essai # 3) après les trois périodes de chauffage démontre, bien que la conversion soit mathématiquement favorable (67,9 %), le mélange réactionnel a subi de multiples transformations non contrôlées. Celles-ci peuvent être de plusieurs natures et l'allure des signaux alcanes sous les 3,0 ppm suggère que des oligomères se soient formés, notamment lorsque des acides plus forts sont employés.⁷⁴ Ceci confirme que la voie directe, bien que chimiquement possible, n'est pas une voie à explorer pour la suite des travaux dû aux multiples réactions non contrôlées qui surviennent quand deux catalyseurs sont présents.

2.2.2 Estérification en flux continu

Le système utilisé pour l'estérification était similaire au système de chimie en continu conçu pour l'isomérisation. La différence majeure était la méthode de contrôle de la température. Comme démontré à la section 2.2.1, la réaction bénéficie d'une baisse de température afin d'atteindre une complétion de plus de 90 %. Cependant, une réaction à température ambiante est plus lente naturellement. C'est pourquoi un système à deux températures de réaction a été développé. La première colonne de 15 cm a été chauffée à une température plus haute où environ 80 % de la conversion aura lieu. La deuxième colonne de 25 cm sera conservée à température ambiante et fournira le milieu réactionnel nécessaire à la conversion finale de la réaction et réduira le retour de celle-ci vers les réactifs. La configuration du système de chimie en continu est photographiée à la figure 2.38 :



Figure 2.38 Système de chimie en continu pour la réaction d'estérification

Ce système comprend les composantes suivantes :

A : Réservoir de mélange réactionnel

B : Pompe à débit variable en ml/min

C : Boucle de préchauffage (50 °C)

D : Colonne de catalyseur (15 cm) chauffée à 50 °C

E : Boucle de refroidissement

F : Colonne de catalyseur (25 cm) à température ambiante

G : Réservoir de récolte du mélange réactionnel

Dans ce système, le mélange réactionnel stocké dans le réservoir est injecté par la pompe à travers la boucle de préchauffage tempérée à 50 °C. Le mélange réactionnel progresse à travers la première colonne de 15 cm à 50 °C et est ensuite refroidi par la boucle de refroidissement plongée dans un bain d'eau froide ou de glace. Le mélange réactionnel progresse ensuite à travers la deuxième colonne de catalyseur de 25 cm à température ambiante. Les bains de billes dans le cas des deux colonnes servent de masse thermique agissant à titre de tampon contre les variations de température. Le mélange est finalement récolté dans le contenant à la sortie de la tubulure. Le contrôleur de température muni d'un thermocouple n'agit qu'à titre d'observateur afin de s'assurer que la colonne à température ambiante demeure à 20 °C tout au long du processus.

Au même titre que pour la réaction d'isomérisation, la porosité des billes Amberlyst 15 devait être déterminée afin de pouvoir calculer le temps de résidence résultant d'un débit de la pompe. Le principe utilisé était le même que précédemment où un volume connu de solide était recouvert de mélange réactionnel liquide. Cependant, dans le cas des billes, un gonflement du catalyseur solide pouvait être observé à l'œil lors de l'ajout du mélange réactionnel. Ce phénomène est attendu des billes Amberlyst 15 puisque celles-ci sont de nature polymérique. Le copolymère constituant le support solide du catalyseur est le styrène-divinylbenzène et forme un réseau interne macroporeux.⁶⁸ Le mélange réactionnel d'un équivalent de camphène (3) et deux équivalents d'acide acétique glacial a été préparé. Dans un cylindre gradué, une quantité connue de billes sèches a été ajoutée (10 mL). Le mélange réactionnel a ensuite été ajouté afin de recouvrir généreusement les billes. Un volume de 12,1 mL de mélange réactionnel a été ajouté sur les billes. Le mélange a été laissé au repos jusqu'au lendemain pour permettre au liquide de pénétrer dans les pores. Lors de la prise de mesures, le surnageant a été retiré. Au final, le volume des billes expansées était de 17 mL, tandis que le volume de mélange réactionnel nécessaire pour les recouvrir,

dans leur état expansé était de 5,1 mL. Selon le même calcul qu'appliqué aux nanotubes de TiO₂ précédemment étudiés, le volume libre était donc de 30 %. Calculé à la lumière de ces données, le volume libre de chaque colonne remplie de billes expansées était de 0,8 mL et 1,2 mL pour les colonnes de 15 cm et 25 cm respectivement, le total étant de 2,00 mL. Les temps de résidence pouvaient donc être calculés pour les différents débits de la pompe qui seraient utilisés :

Débit (mL/min)	Temps de résidence (min)
0,1	20,0
0,2	10,0
0,5	4,0
1,0	2,0
2,0	1,0
3,0	0,7
5,0	0,4
10,0	0,2

Tableau 2.5 Temps de résidence en fonction du débit pour la résine Amberlyst 15

Le tableau 2.5 présente ces temps de résidence, plus faibles que ceux calculés pour l'isomérisation puisque le volume disponible au travers du catalyseur est inférieur. Il y a donc moins d'espace disponible pour le mélange réactionnel et conséquemment, un volume défini progressera plus rapide à travers la colonne de catalyseur. Le temps de contact maximal pour cette réaction est donc de 20,0 minutes au débit le plus faible de 0,1 mL/min.

Comme discuté au point 2.2.1, une température ambiante permet de pousser la réaction vers la complétion et c'est pourquoi la deuxième colonne, de 25 cm, a été conservée à température ambiante (20 °C) dans tous les essais. Cependant, la température de la première colonne, de 15 cm, a été variée afin d'obtenir une conversion rapide tout en étant sélectif et sans dégrader le produit. Trois températures ont été évaluées soit 20 °C, 40 °C et finalement 60 °C. Les équivalents d'acide acétique ont été conservés à deux par équivalent de camphène (3) et le même lot de résine Amberlyst 15 a été utilisé dans le but d'éliminer les variables provenant des lots. Avant le prélèvement de chaque échantillon à un débit spécifique, trois temps de résidence devaient s'écouler afin de s'assurer que le système était stabilisé. Les

échantillons ont été analysés par RMN ^1H par leurs signaux caractéristiques et la conversion a été calculée. Les graphiques des trois températures ont ensuite été construits et sont présentés aux figures 2.39, 2.40 et 2.41 :

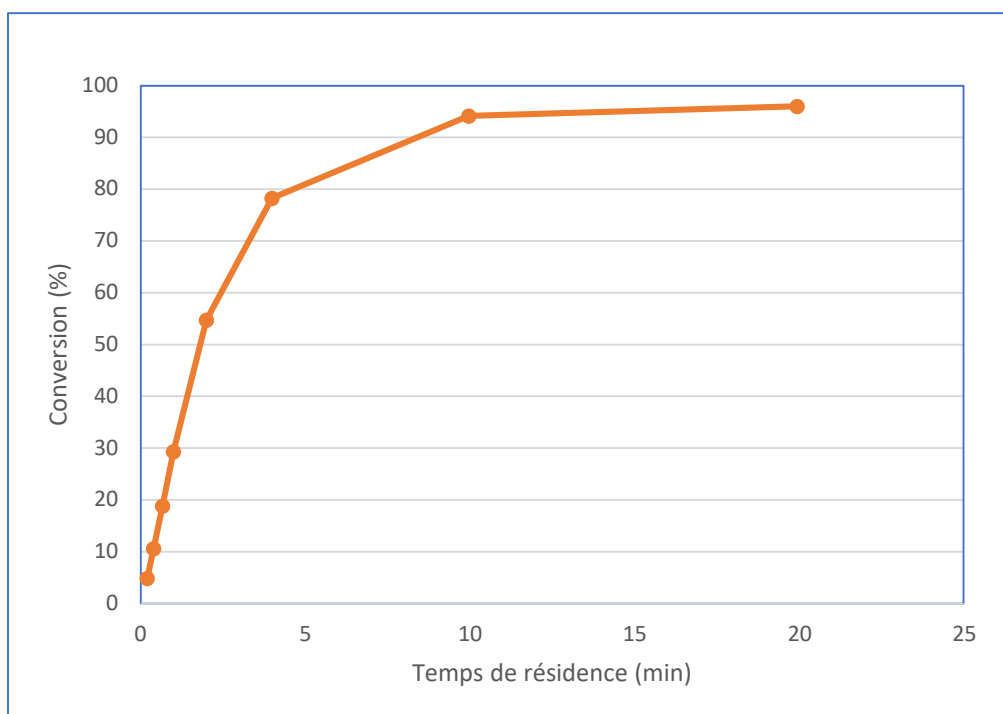


Figure 2.39 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique, 20 °C

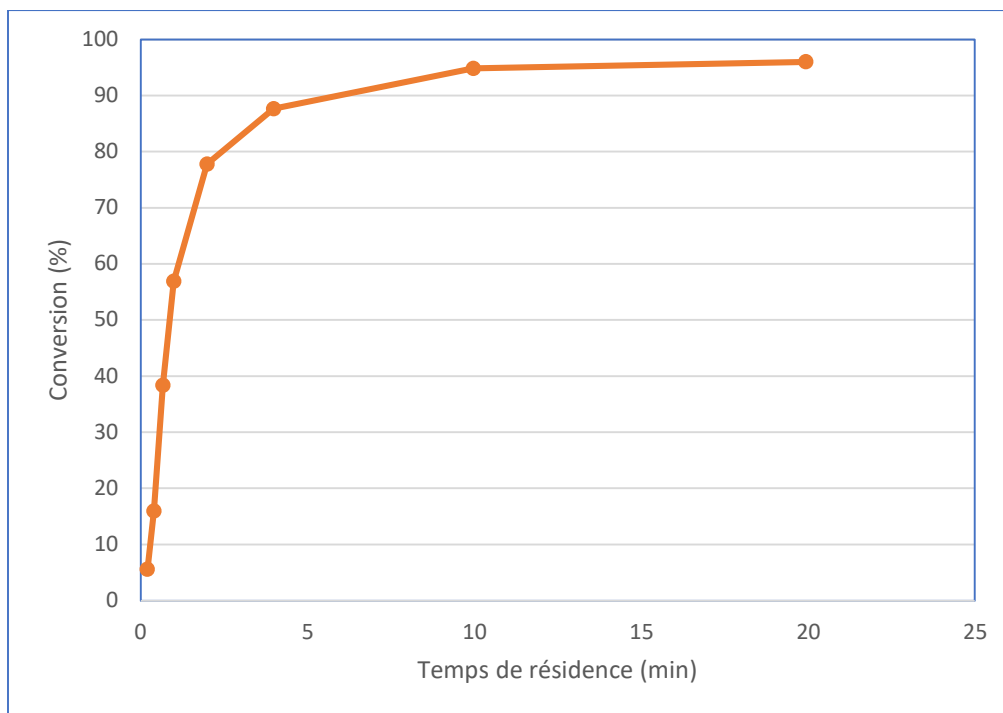


Figure 2.40 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique, 40 °C puis 20 °C

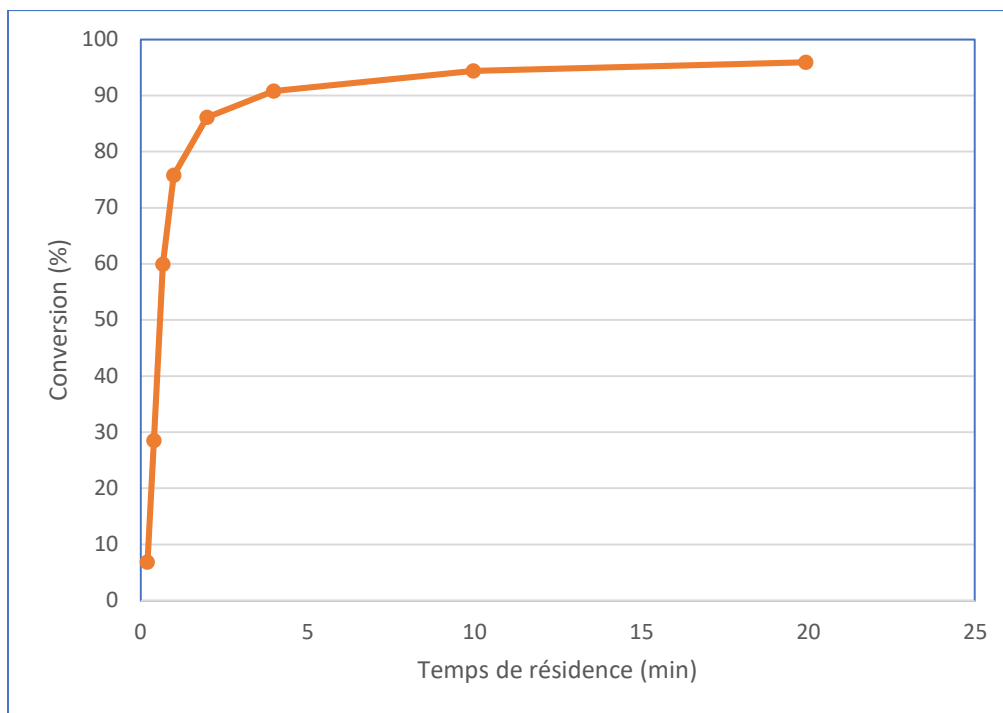


Figure 2.41 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique, 60 °C puis 20 °C

À première vue, les trois graphiques semblent identiques. Cependant, une superposition des courbes, à la figure 2.42, permet de bien visualiser l'effet de la température sur la progression de la réaction :

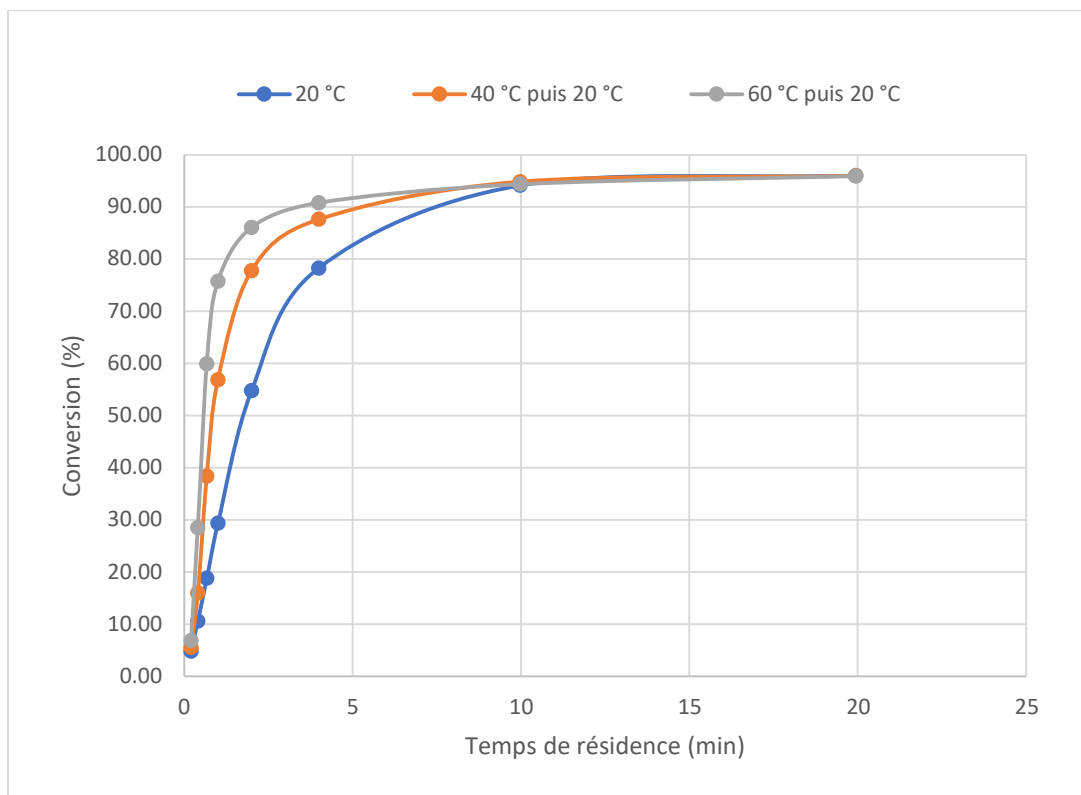


Figure 2.42 Conversion du camphène en acétate d'isobornyle avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique à trois températures

Cette superposition permet d'observer que la réaction à 60 °C puis 20 °C progresse plus rapidement qu'aux deux autres températures et stagne à environ 95 % de complétion à un temps de résidence de 10 minutes. À un temps de résidence de 5 minutes, une différence de 1 à 2 % d'avancement peut être observée. Les courbes à 60 °C et 40 °C convergent à environ 7,5 minutes de temps de résidence. Un temps de résidence de 10 minutes semble donc suffisant pour compléter la réaction aux températures étudiées. À plus haute température, les risques de réactions secondaires sont aussi augmentés. L'avantage de la vitesse de réaction que procure une température de 60 °C n'était pas suffisant pour justifier une hausse. À la lumière de ces données, la décision a été prise de réaliser la réaction d'estérification à 40 °C.

À la suite de la détermination de la température idéale pour la réaction, la possibilité d'utiliser les ultrasons afin d'augmenter la réactivité a été étudiée. La radiation ultrasonique étant connue pour accélérer une réaction, il était logique de supposer que cette méthode pouvait s'appliquer à la présente réaction.⁷⁵ Dans

un contexte industriel, le mélange serait circulé dans un système muni d'une sonde générant les ultrasons. Au laboratoire, les colonnes ont été placées dans un bain ultrasons. Puisque tempérer une colonne à la température optimale de 40 °C tout en gardant l'autre à 20 °C s'avérait compliqué à mettre en œuvre avec un seul bain à ultrasons, la température ambiante a été sélectionnée pour les deux colonnes. Tout comme pour les réactions précédentes, des échantillons ont été prélevés lorsque le système était stable. Le graphique des conversions en fonction du temps de résidence a ensuite pu être tracé et superposé avec l'expérience à température ambiante sans ultrasons à la figure 2.43 :

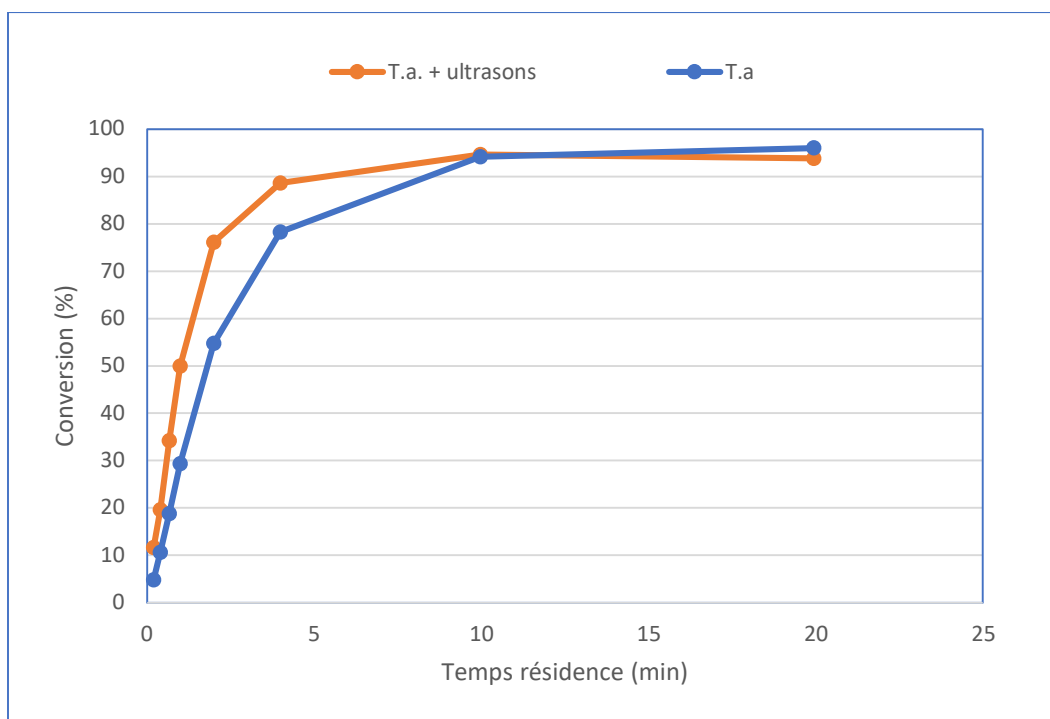


Figure 2.43 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique, avec et sans ultrasons. T.a.

Une convergence des courbes est observée à un temps de résidence de 10 minutes. Ceci est similaire aux réactions menées à plus hautes températures précédemment étudiées. Une augmentation de la réactivité est cependant notable suivant l'application des ultrasons aux colonnes de catalyseur. L'application de cette méthode est donc bénéfique pour la réaction d'estérification à l'étude. Une comparaison avec la réaction menée à 40 °C révèle davantage d'informations comme le démontre la figure 2.44 :

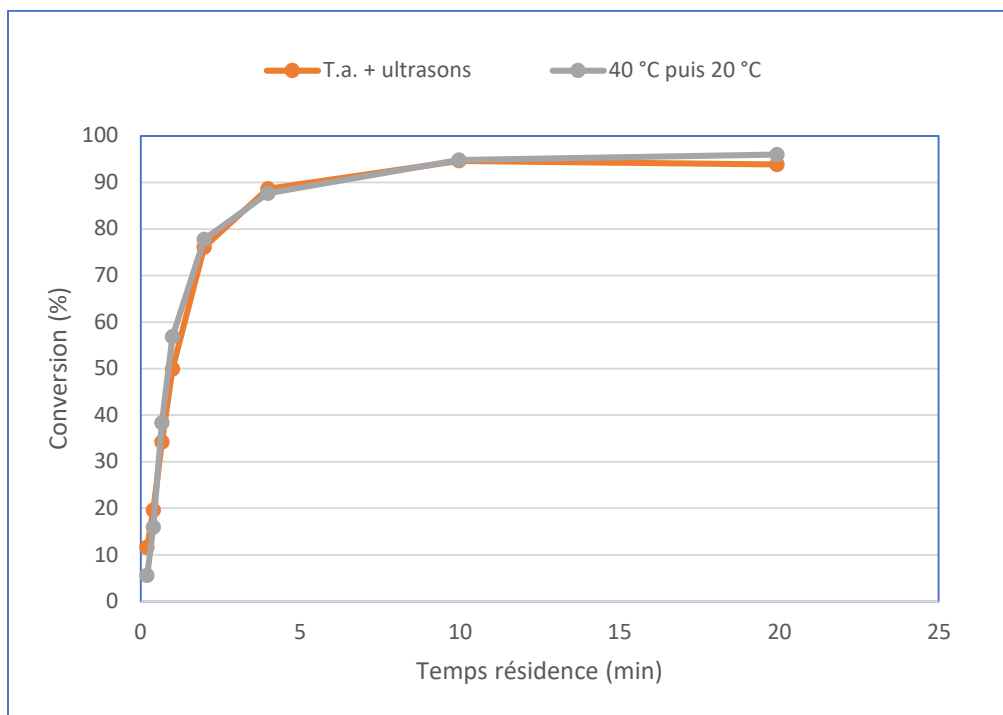


Figure 2.44 Conversion du camphène en acétate d'isobornyle avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique - Ultrasons et 40 °C

L'application des ultrasons sur la réaction à 20 °C a un effet pratiquement identique à l'augmentation de la température à 40 °C. Il est donc possible de réaliser cette réaction à la température ambiante, si des équipements de chauffage n'étaient pas disponibles lors de la production industrielle. L'objectif n'était pas ici de déterminer si les ultrasons devaient absolument être utilisés, mais seulement de fournir des alternatives lorsqu'une ligne de production serait mise en place par le client. Est-ce que le choix sera de chauffer à 40 °C comme précédemment démontré ou est-ce que les ultrasons seront choisis afin d'accélérer la réaction ? Cela dépendra des installations et des équipements à la portée du client ainsi que des coûts reliés à l'implantation de tels systèmes.

Un dernier paramètre à étudier dans un contexte de chimie en continu était les équivalents d'acide acétique nécessaires afin de compléter la réaction. Comme discuté précédemment au point 2.2.1, les équivalents d'acide acétique se devaient d'être entre 1,5 et 2 afin de maximiser la vitesse et la complétion de la réaction tout en réduisant les coûts. La réaction a été testée avec deux équivalents ci-dessus. Un essai à 1,5 équivalent a donc été planifié. La température choisie était de 40 °C pour la première colonne de 15 cm et 20 °C ou température ambiante pour la seconde colonne, de 25 cm de longueur. Les résultats de conversion ont été traités et tracés en fonction du temps de résidence. Si la courbe à 2 équivalents d'acide acétique à la même température y est superposée, il est possible d'observer l'effet des équivalents sur la réaction à la figure 2.45 :

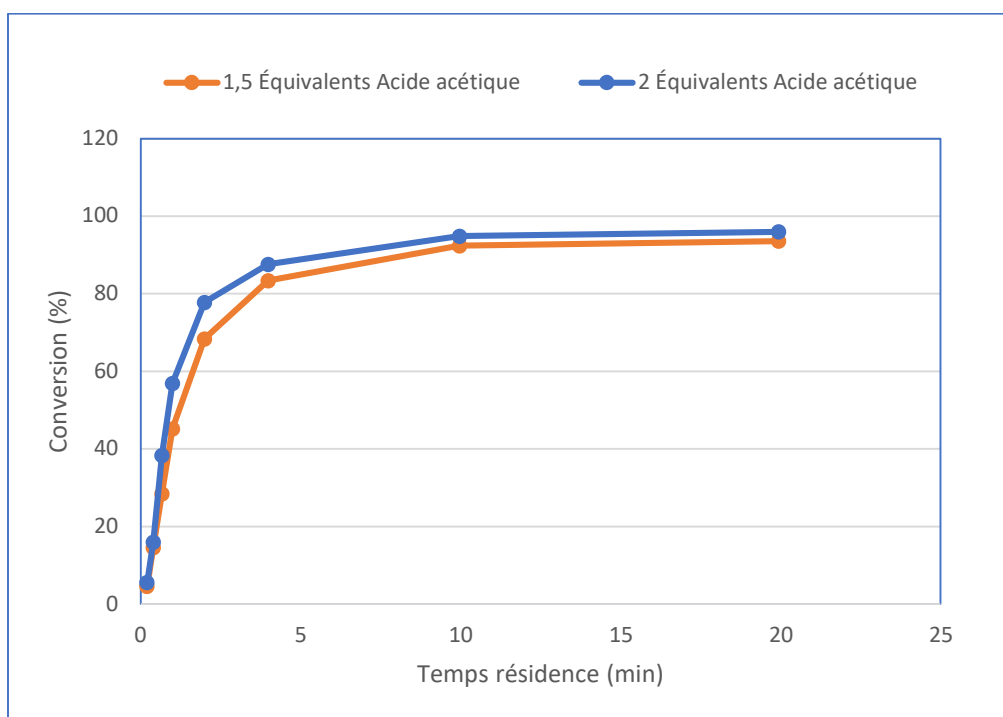


Figure 2.45 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 1.5 eq acide acétique – chimie en continu, 40 °C puis 20 °C

La conversion progresse rapidement comme démontré précédemment. En comparaison à la réaction menée avec deux équivalents d'acide acétique, celle-ci semble stagner juste au-dessous. La différence majeure est la vitesse de réaction. À deux équivalents, la réaction se complète plus rapidement comme le

démontre l'écart entre les deux courbes entre 0 à 5 min de temps de résidence. L'écart s'amenuise au fur et à mesure que la réaction approche de la complétion. Toutefois, puisque l'acide acétique est un réactif bon marché et qu'il était prévu de le récupérer lors des purifications, la décision a été prise de conserver deux équivalents d'acide acétique lors de la production.

L'expérience visant à produire une quantité notable (200-300 g) d'acétate d'isobornyle (4) était appelée la « production ». Par la même occasion, l'empoisonnement du catalyseur ou la baisse de sa réactivité suite au passage de mélange réactionnel a été déterminé. Comme effectué précédemment, la baisse de réactivité sera caractérisée par un point d'inflexion dans le graphique de la conversion en fonction de la masse de camphène (3) traitée. Les conditions de réaction optimales pour la chimie en continu ayant été déterminées, elles ont été appliquées lors de cette production afin de simuler une production industrielle. Deux équivalents d'acide acétique ont été ajoutés au camphène (3) commercial et la première colonne de 15 cm a été chauffée à 40 °C. La deuxième colonne, de 25 cm, était conservée à température pièce soit 20 °C. Le débit idéal, assez bas pour permettre une complétion de la réaction, mais le plus élevé possible afin d'optimiser la quantité de produit obtenu était 0,2 mL/min. Comme effectué pour la réaction d'isomérisation au point 2.1.4, un réservoir de mélange réactionnel a été rempli, le système a été stabilisé à l'aide de 3 volumes ou temps de résidence avant le prélèvement d'échantillon. À ce débit, le temps de résidence était de 9,97 minutes. Un délai de 30 minutes a donc été observé avant le premier échantillon. Comme le débit ne changeait pas lors de cette expérience, le système a pu être maintenu en fonction sans interruption. Des échantillons ont été prélevés à divers moments de la journée, et ce sur plusieurs jours. L'heure de début et l'heure de prélèvement des échantillons ont été notées, permettant le calcul du temps écoulé et conséquemment, du volume de mélange réactionnel traité. Le volume de camphène (3) traité, considérant que le mélange contenait un équivalent de camphène (3) et deux équivalents d'acide acétique a été calculé. Finalement, avec la densité du camphène (3) de 0,842 g/mL, la masse de camphène (3) traitée a été calculée. C'est avec cette masse de camphène (3) traitée en abscisse que le graphique a été construit tel qu'à la figure 2.46 :

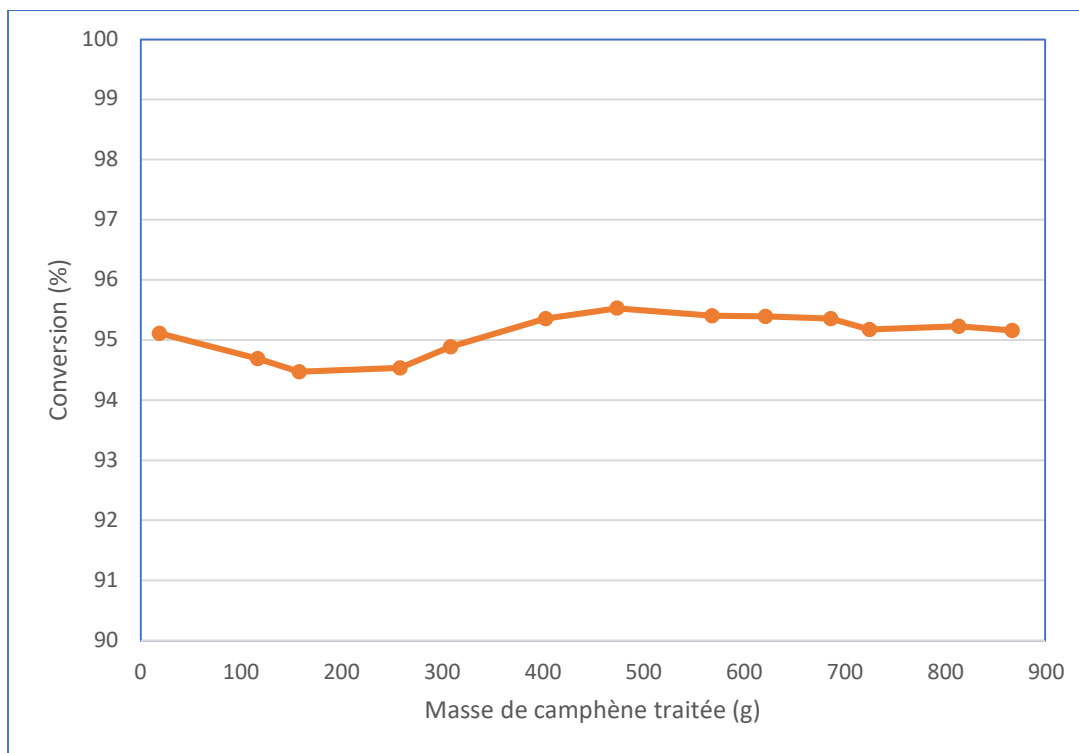


Figure 2.46 Conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) avec Amberlyst 15, 2 eq acide acétique, chimie en continu, 40 °C puis 20 °C sous un débit de 0.2 ml/min

Comme le démontre le graphique, la conversion du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) sous les conditions est stable tout au long du processus. Aucune baisse de pureté notable n'a été observée par RMN ^1H . La réaction a été stoppée après 145 heures par manque de mélange réactionnel, correspondant à une masse de camphène (3) convertie de 865 g, et ce sur une quantité de 3,4 g de résine Amberlyst 15 présente dans les cartouches. Si la réaction avait été poursuivie, cette quantité de camphène (3) traitée aurait vraisemblablement été plus élevée, puisque rien n'indiquait une baisse de réactivité imminente. Ramené sur 1 kg de résine et en tenant compte des masses molaires des composés disponibles au tableau 1.2, il est donc possible d'estérifier au moins 247 kg de camphène (3) et donc de produire au moins 355 kg d'acétate d'isobornyle (4). Cette information est cruciale dans un contexte industriel où une cartouche de catalyseur serait utilisée. Cette quantité permettrait de savoir à quel moment elle doit être changée pour une cartouche neuve afin de maintenir une production sans interruption. La quantité produite a ensuite été utilisée afin de tester différentes méthodes de purification.

2.2.3 Purification de l'acétate d'isobornyle (4) obtenue

La purification de l'acétate d'isobornyle (4) a été planifiée en fonction de méthodes transposables à l'échelle industrielle. Deux méthodes ont été explorées, soit l'une en lot et l'autre en continu. La méthode en lot s'agissait d'une extraction liquide-liquide et d'un lavage à l'eau. Cette méthode est réalisable à l'échelle industrielle dans des ampoules ou des réservoirs de grande taille. La première extraction a été testée à l'aide d'un solvant organique soit l'heptane dans le cas présent. Le but était d'éliminer l'équivalent en excès d'acide acétique et de conserver les composés organiques tels que l'ester produit. Cette extraction ne permettrait toutefois pas de séparer le camphène (3) résiduel de l'acétate d'isobornyle (4). Pour réaliser cette extraction, une masse de 50 g de mélange réactionnel précédemment a été mélangée avec 100 mL d'eau distillée et 100 mL d'heptane. Le mélange a été agité dans une ampoule à extraction et a ensuite été laissé au repos. Une séparation nette des phases a été observée sans émulsion. La phase organique a été lavée avec une portion d'une solution NaHCO_3 afin d'éliminer toute trace d'acide. La phase organique a finalement été séchée avec du sulfate de magnésium anhydre et filtrée. Le solvant a été évaporé à l'évaporateur rotatif et le liquide obtenu a été pesé. La récupération a été calculée selon la masse d'acétate d'isobornyle (4) présente dans les 50 g extraits soit 37,70 g. Le produit obtenu a été mesuré à 35,37 g pour un rendement de 93,82 %. Une analyse par RMN ^1H a été réalisée afin de confirmer l'identité du produit et d'avoir un indice sur la pureté et est présentée à la figure 2.47 :

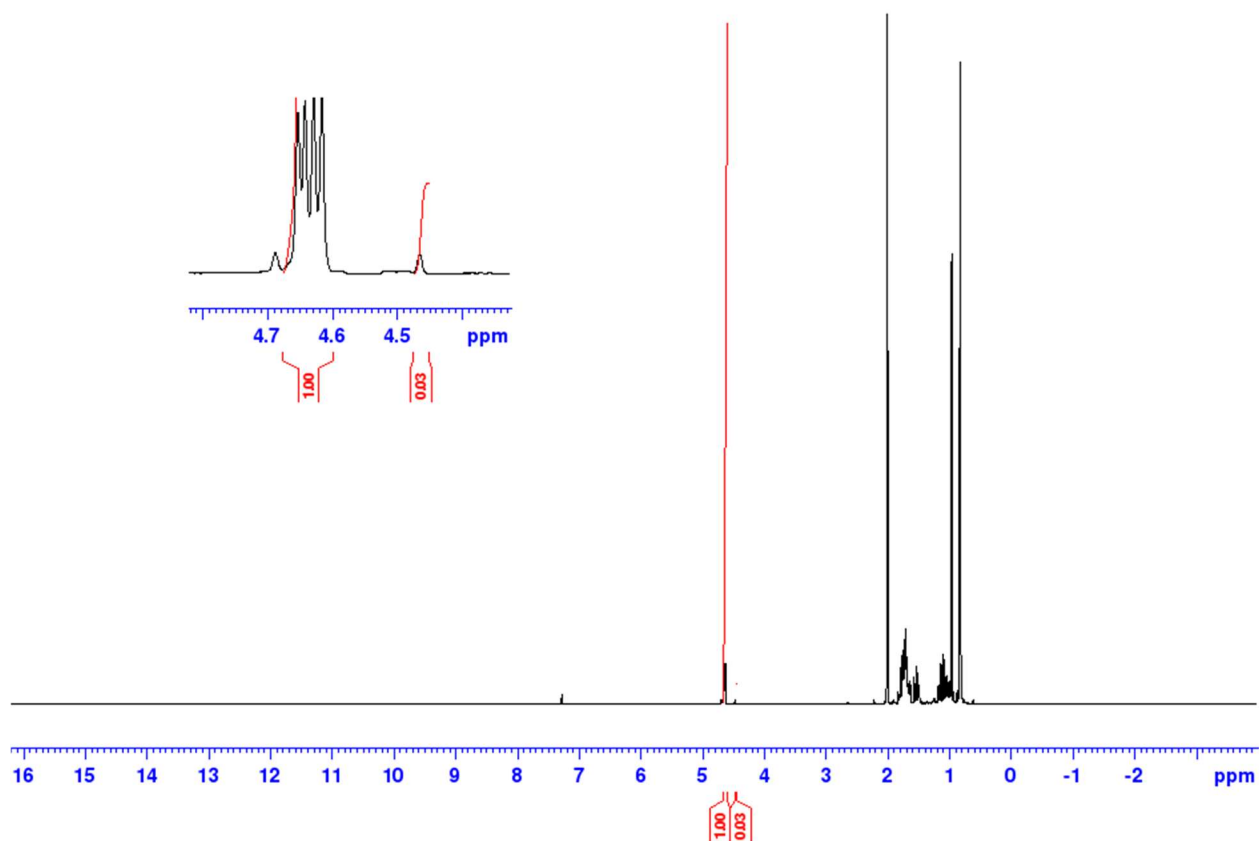


Figure 2.47 Spectre RMN ^1H du produit obtenu par extraction à l'heptane

Le signal caractéristique de l'acétate d'isobornyle (4) à 4,65 ppm est majoritaire, tandis que les signaux du camphène (3) sont présents à leurs emplacements respectifs, mais sont minoritaires. La pureté calculée sur les bases du spectre RMN est de 2,04 % massique de camphène (3) et donc de 97,96 % massique d'acétate d'isobornyle (4).

Une extraction similaire utilisant l'acétate d'éthyle a été aussi réalisée. Ce solvant a été choisi puisqu'il est relativement non toxique comparativement à l'heptane et il est aussi disponible en grade alimentaire. Les résultats sont similaires à l'extraction utilisant l'heptane avec un rendement de 93,58 % et une pureté en acétate d'isobornyle (4) de 98,05 % :

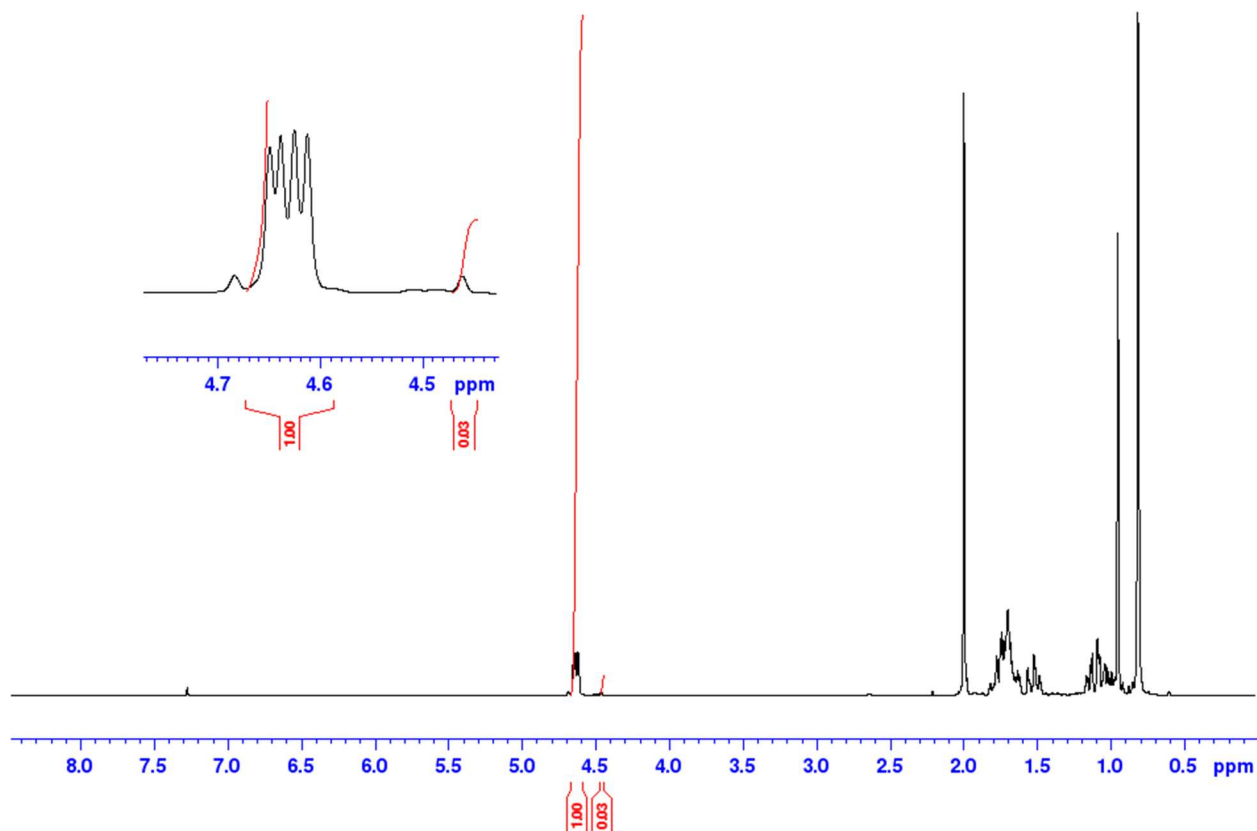


Figure 2.48 Spectre RMN ^1H du produit obtenu par extraction à l'acétate d'éthyle

Tel que le démontre la figure 2.48, dans les deux cas d'extraction au solvant, aucune trace des solvants utilisés n'a été détectée par RMN.

La prochaine extraction a été réalisée sans solvant dans le but d'éliminer l'évaporation et le contact avec un solvant complètement. De manière identique aux extractions au solvant, une masse de 50 g de mélange réactionnel issu de la production a été ajoutée dans une ampoule avec 100 mL d'eau distillée. Les deux phases ont été agitées et ensuite laissées au repos. Une séparation nette a toujours été observée. La phase aqueuse a été éliminée et la phase organique a été lavée avec une portion d'une solution de bicarbonate de sodium afin d'éliminer les traces d'acide acétique. La phase organique a été séchée à l'aide de sulfate de magnésium anhydre et ensuite filtrée. Aucun rinçage au solvant n'a été effectué et la masse recueillie a été pesée pour un total de 29,503 g. Selon les 37,70 g attendus, cela correspond à un rendement de 78,25 % massique, ce qui est légèrement moins que les extractions au solvant, mais tout de même raisonnable. Une analyse RMN ^1H a été réalisée afin de calculer la pureté :

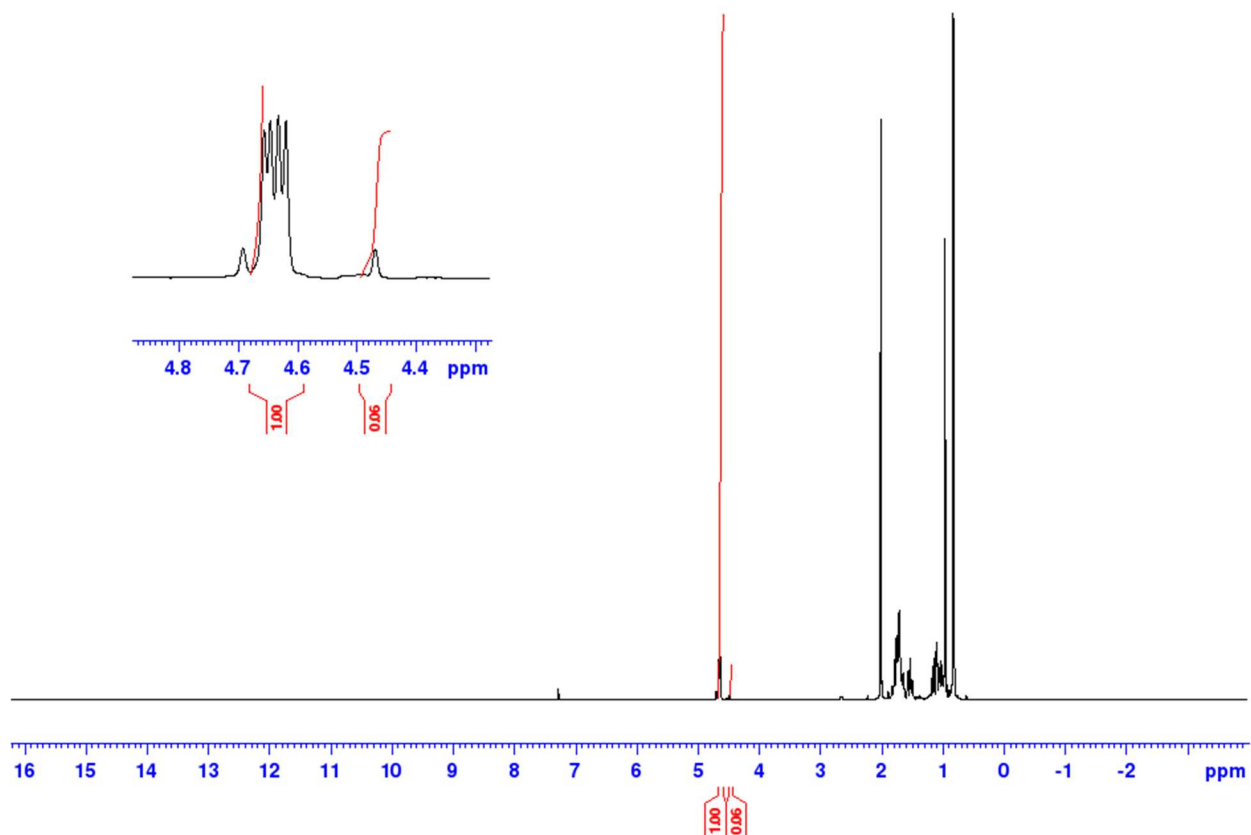


Figure 2.49 Spectre RMN ^1H du produit obtenu par extraction sans solvant

Selon l'analyse RMN ^1H à la figure 2.49, la pureté de l'acétate d'isobornyle (4) était de 96,20 % massique. Cette valeur est juste en dessous des puretés obtenues par extraction au solvant, mais est toujours très haute et acceptable pour un procédé industriel. Dans le cas des extractions, l'acide acétique n'est pas récupéré. Ceci rend impossible la réinjection de l'acide en excès dans le procédé afin de le réutiliser pour une réaction subséquente. De plus, la phase aqueuse acidifiée devra être neutralisée avant d'être rejetée, ce qui engage des frais pour l'achat de l'agent neutralisant ou pour la destruction, si le contrat est confié à une tierce partie. Aussi, le camphène (3) n'est pas séparé de l'ester désiré, ce qui contamine le produit final et ne permet pas de réutiliser ce substrat pour la réaction. Malgré un bon rendement, ce sont les faiblesses des méthodes de purification par extraction, avec ou sans solvant.

La dernière méthode tentée pour purifier le produit était la distillation. Comme discuté à la section portant sur la purification du camphène (3), soit 2.1.5, la distillation peut être réalisée en continu. Une distillation classique peut cependant déterminer l'efficacité de cette technique qui sera ensuite transposée à un

ystème de distillation sur film essuyé dans un contexte industriel. Dans un montage de distillation classique au laboratoire, 50 g de mélange réactionnel issu de la production a été ajouté et chauffé sous pression réduite. La température a été réglée à 76 °C. Cette température a été choisie selon le système utilisé. Le vide maximal obtenu était de 10 torrs. À cette pression, les températures d'ébullition de l'acide acétique, du camphène (3) et de l'acétate d'isobornyle (4) sont de 10 °C, 43 °C et 104 °C respectivement. Le contrôle de la distillation a été fait avec le vide puisque la pompe permettait un contrôle plus fin des conditions. C'est-à-dire qu'à température constante de 76 °C, la pression a été réduite graduellement jusqu'à obtenir un condensat. À cette température, les pressions nécessaires pour évaporer l'acide acétique, le camphène (3) et l'acétate d'isobornyle (4) étaient de 223 torrs, 54 torrs et 3 torrs respectivement. Puisqu'un système de distillation laboratoire ne possède pas une grande surface de refroidissement comparativement à des équipements industriels, il était attendu que l'acide acétique et le camphène (3) ne soient pas ou peu condensés. L'échantillon visé serait donc l'acétate d'isobornyle (4) désiré, les deux réactifs étant probablement perdus lors de la distillation. À la suite de cette purification, une quantité de 33,81 g de produit a été récupérée du ballon original et non distillé. Le rendement a été calculé à 89,68 % selon cette masse. Une analyse RMN ¹H a aussi été réalisée afin de déterminer une pureté :

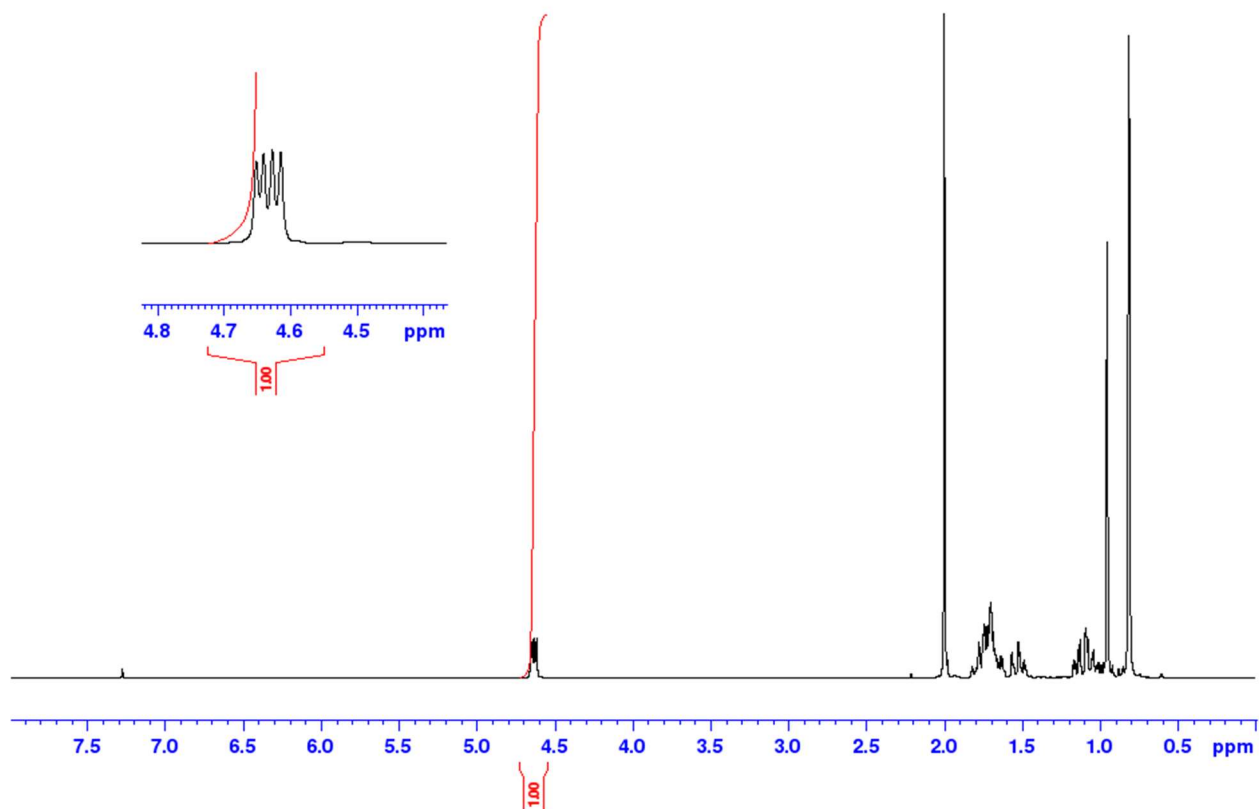
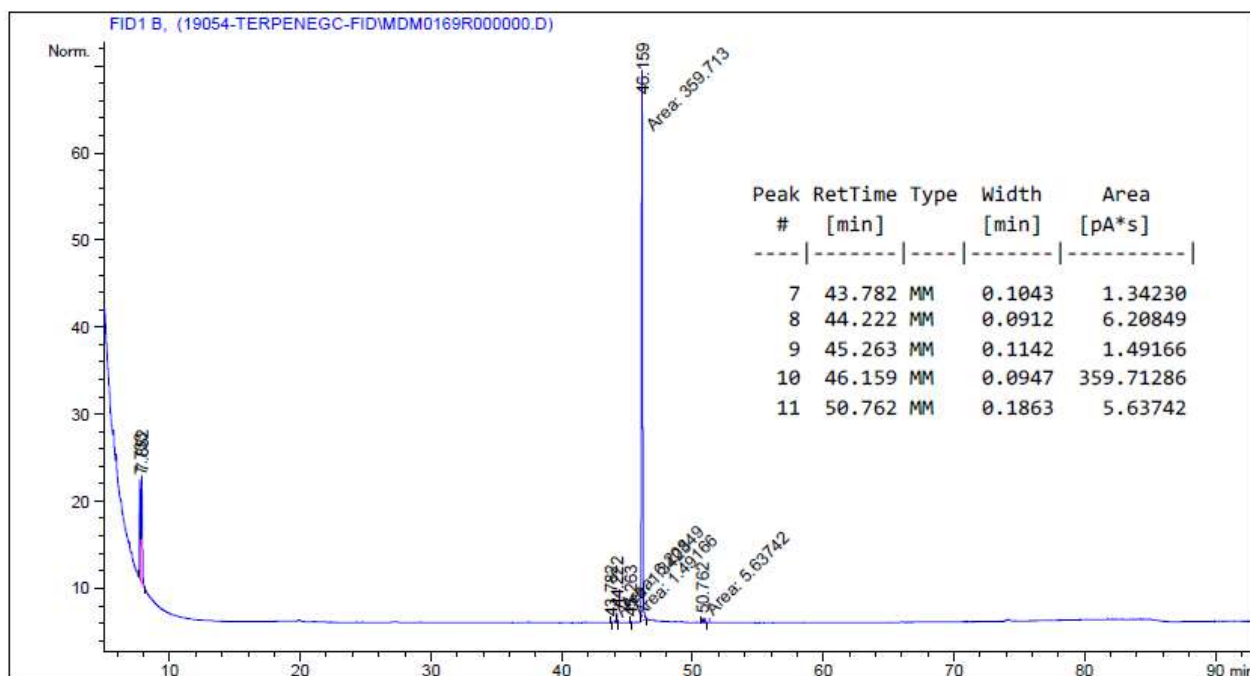


Figure 2.50 Spectre RMN ^1H du produit obtenu par distillation

À la figure 2.50, le spectre RMN ^1H ne détecte pas de signal correspondant au camphène (3). Cette pureté serait donc de 100 % ou presque. Une analyse GC-FID, plus sensible, est nécessaire afin de confirmer cette valeur et est disponible à la figure 2.51 :



La pureté calculée selon les aires des pics obtenus par GC-FID est de 96,08 %, ce qui est comparable aux puretés obtenues pour les autres méthodes, ces dernières ayant été obtenues par résonance magnétique nucléaire du proton. Les résultats issus des purifications par différentes méthodes, soit les rendements et puretés sont rassemblés au tableau 2.6 :

Méthode	Rendement	Pureté	Récupération Camphène (3)	Récupération acide
	(%)	(%)	(O/N)	(O/N)
Extraction sans solvant	78,25	96,20	N	N
Extraction Heptane	93,82	97,96	N	N
Extraction EtOAc	93,58	98,05	N	N
Distillation	89,68	96,08	O	O

Tableau 2.6 Méthodes de purification de l'acétate d'isobornyle (4)

Parmi les méthodes de purification examinées, la distillation ressort comme ayant une pureté haute ainsi qu'un rendement légèrement moindre que les extractions avec solvant, mais supérieur à l'extraction sans solvant. À ce point, c'est cette technique, réalisable en lot ou en continu selon le système, qui serait recommandée pour une production industrielle. Le camphène (3) et l'acide acétique distillés seraient aussi récupérés dans un système comprenant un refroidissement bien calibré. Ces deux réactifs pourraient alors être réinjectés dans le mélange réactionnel initial afin de minimiser les pertes et les résidus. Ce dernier point peut sembler anodin en laboratoire, mais influence grandement la faisabilité d'un procédé en réduisant les déchets et en augmentant la rentabilité d'un procédé industriel.

2.3 Détermination du chemin synthétique

Suite aux réactions étudiées aux points 2.1 et 2.2, certaines questions subsistaient. Les énantiomères des produits résultants d'énantiomères spécifiques des réactifs doivent être déterminés. C'est ce qui est nommé le « chemin synthétique chiral » pour les besoins de cette étude. Les énantiomères de produits pouvant avoir des effets variés comme antigerminatif, il est impératif d'étudier davantage cet aspect des synthèses. De plus, puisqu'une demande de brevet est en cours, il faut s'assurer de protéger les énantiomères seuls et/ou le mélange racémique afin d'éviter d'être contourné par des concurrents. Précisément, il faut déterminer l'énantiomère du camphène (3) qui résulte de l'isomérisation du α -pinène (1) (+) ou (-). De la même façon, la réaction du β -pinène (2) en camphène (3) sera étudiée. Finalement, les énantiomères du camphène (3) subiront l'estérification afin de déterminer les énantiomères d'acétate d'isobornyle (4) obtenus.

2.3.1 Isomérisation

En premier lieu, les produits commerciaux doivent être davantage caractérisés. Les chromatogrammes des α -pinènes (1) et du β -pinène (2) ont déjà été obtenus à la section 1.1.4 et ces données seront utilisées pour les fins de calcul. Les chromatogrammes GC-FID chiraux du (+)- α -pinène (1), du (-)- α -pinène (1), du α -pinène (1) racémique et du β -pinène (2) commerciaux, sont présentés aux figures 1.16 et 1.17, 1.18 et 1.1.9 respectivement. Les données extraites de ces chromatogrammes, spécifiquement les intégrations des signaux, sont résumées au tableau 2.7 suivant :

Produit commercial	Énantiomère	Temps de rétention	Aire sous la courbe	Teneur
		(min)	(pA*s)	(%)
(+)- α -pinène (1)	(+)	22,925	554,19269	96,0
	(-)	22,491	23,10681	4,0
(-)- α -pinène (1)	(+)	23,130	280,16629	21,4
	(-)	22,481	1026,52222	78,6
α -pinène (1)	(+)	23,168	107,72823	50,4
Racémique	(-)	22,630	105,90516	49,6
(-)- β -pinène (2)	(+)	25,689	11,31967	3,5
	(-)	26,387	311,16751	96,5

Tableau 2.7 Teneurs énantiomériques des α -pinènes (1) et β -pinènes (2) commerciaux

L'analyse GC-FID chirale des énantiomères commerciaux du α -pinène (1) confirme que le (+)- α -pinène (1) est énantiomèrement très enrichi à 96,0 % tandis que l'énantiomère (-) contient une proportion notable de l'énantiomère (+) de 21,4 %. Ceci n'est pas gênant, puisqu'il sera tout de même possible d'observer l'énantiomère majoritaire du camphène (3) obtenu par chromatographie gazeuse. Le α -pinène (1) vendu comme racémique est confirmé être racémique avec une proportion pratiquement égale des énantiomères. Quant au (-)- β -pinène (2), il est effectivement enrichi à 96,5 % de l'énantiomère (-).

Selon les conditions de réactions déterminées à la section 2.1 « Isomérisation du α -pinène (1) et β -pinène (2) », les énantiomères du α -pinène (1) commerciaux ont été isomérisés. Pour cette réaction, 10 g des α -pinènes (1) ont été ajoutés dans des flacons munis d'agitateurs magnétiques. Environ 0,5 g de catalyseur (nanotubes d'oxyde de titane précédemment synthétisés) a été ajouté et les flacons ont été plongés dans un bain d'huile chauffé à 120 °C. Un suivi RMN ^1H a été fait afin de suivre la conversion. Après six heures, la réaction était complétée à 88 % pour le pinène (+) et 70 % pour le pinène (-). Les deux réactions ont été

arrêtées à ce point. Le mélange réactionnel a été filtré sur un filtre à seringue de 0,45 μm en PTFE et une solution de concentration 2 mg/mL a été préparée dans l'heptane HPLC pour analyse GC-FID chirale selon la méthode développée :

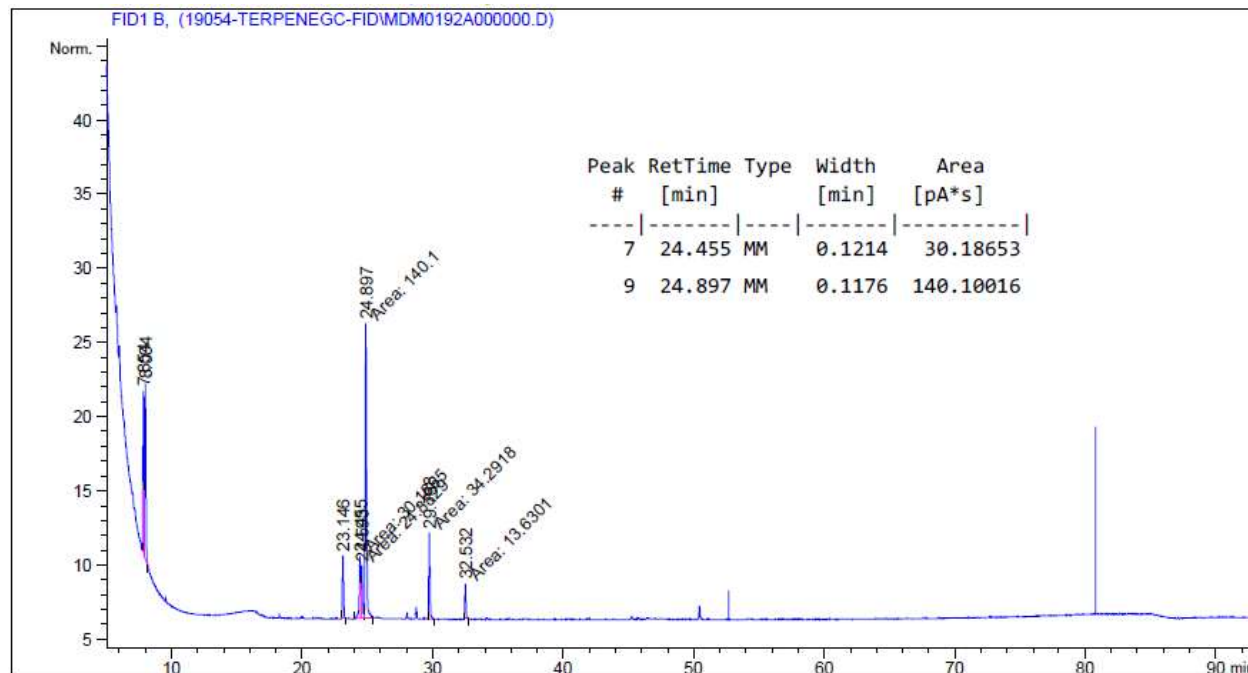


Figure 2.52 Chromatogramme du produit d'isomérisation du (+)- α -pinène (1)

Selon les temps de rétention répertoriés à la section 1.1.4, le signal majoritaire à 24,897 min de la figure 2.52 appartient au (-)-camphène (3) comptant pour 82,3 % tandis que le signal à 24,455 min correspond à l'énantiomère (+) du camphène (3) à raison de 17,7 %. Ce résultat est inattendu puisque si une racémisation complète était observée, un rapport 1 : 1 des énantiomères serait observé. Si la réaction n'était pas racémisante, les proportions des énantiomères devraient être les mêmes que les produits initiaux utilisés. Il s'agit donc d'une racémisation partielle pour cette réaction d'isomérisation.

Le même phénomène peut être observé avec le résultat de l'isomérisation du (-)- α -pinène (1) :

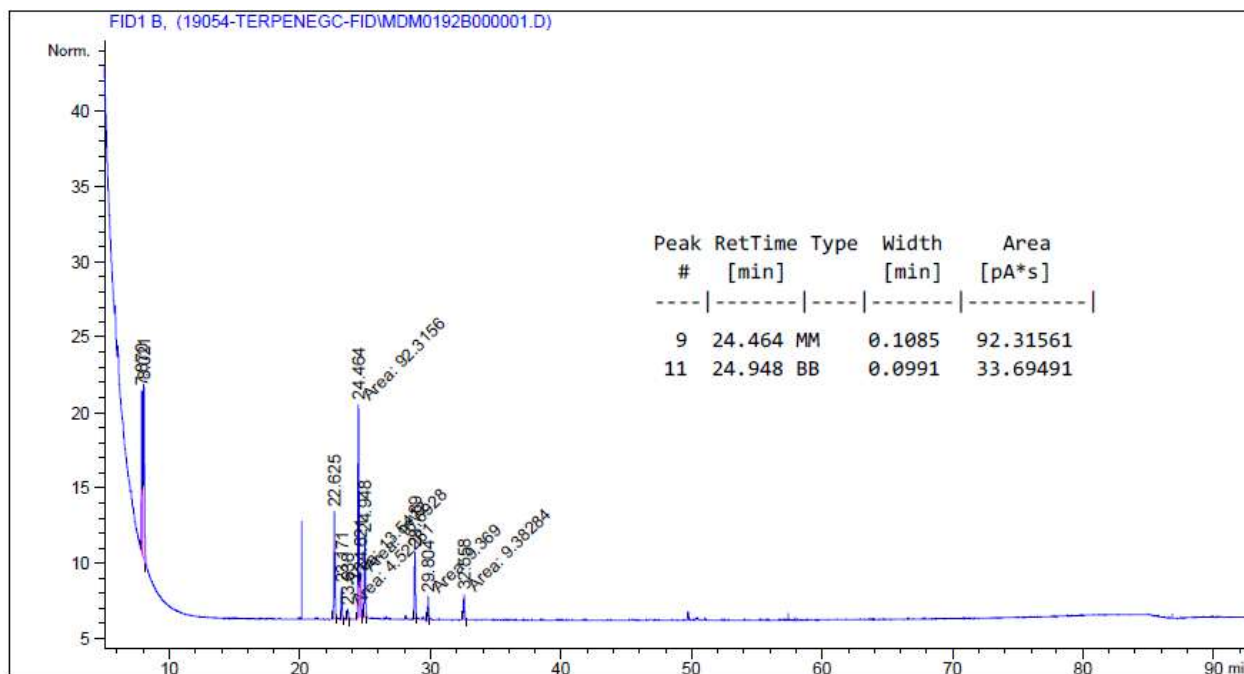


Figure 2.53 Chromatogramme du produit d'isomérisation du (-)- α -pinène (1)

Les aires calculées du chromatogramme à la figure 2.53 correspondent à une proportion de 73,3 % de (+)-camphène (3) et 26,7 % de (-)-camphène (3). Ici encore, il serait attendu d'obtenir soit 50/50 ou 78,6 % et 21,4 %. Il serait possible d'attribuer cette différence à l'interprétation du chromatogramme. Avant de conclure, il a été décidé de poursuivre avec l'isomérisation du β -pinène (2), espérant obtenir davantage d'informations.

En complément, l'isomérisation du α -pinène (1) racémique a été réalisée. Sans surprise, celle-ci résulte en un mélange racémique de camphène (3). Le chromatogramme est disponible à l'annexe D, section 2.3.1.

Le (-)- β -pinène (2) commercial, seul énantiomère obtenu, a été caractérisé par la même méthode que le α -pinène (1). Une masse de 10 g de (-)- β -pinène (2) a été agitée avec 0,5 g de nanotubes de TiO₂ à 120 °C et suivi par RMN ¹H à chaque heure. Après deux heures seulement, la réaction était complète et le mélange a été filtré sur un filtre PTFE de porosité nominale de 0,45 μ m pour qu'ensuite une solution de 2 mg/mL dans l'heptane HPLC soit préparée. Le chromatogramme obtenu est présenté à la figure 2.54 :

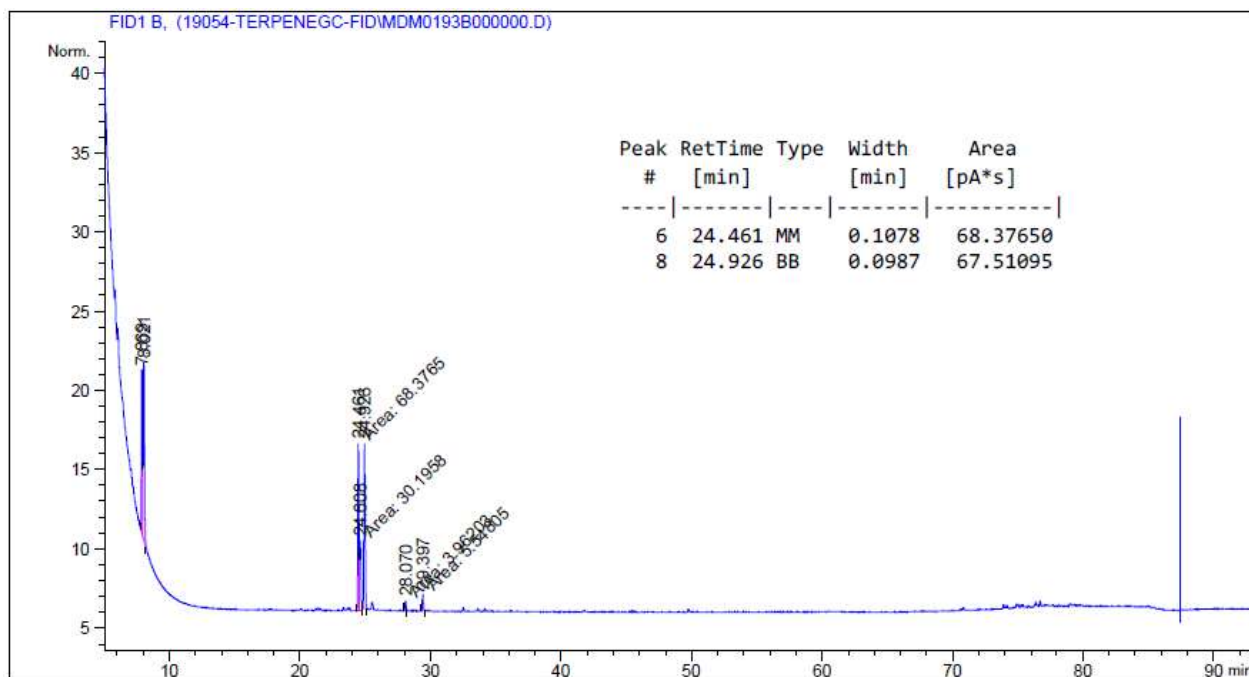


Figure 2.54 Chromatogramme du produit d'isomérisation du (-)- β -pinène (2)

Puisque les deux signaux sont d'égales intensités, la réaction d'isomérisation du (-)- β -pinène (2) est conclue être racémisante. Il est raisonnable de supposer que l'isomérisation du (+)- β -pinène (2) aurait aussi été racémisante puisque le mécanisme est le même dans les deux cas.

À la lumière des informations recueillies quant aux isomérisations, l'hypothèse est que l'isomérisation du α -pinène (1) peut passer par un intermédiaire menant au β -pinène (2), qui à son tour réagit plus rapidement pour former du camphène (3) racémique. Une autre possibilité est que la réaction du β -pinène (2) au camphène (3) pourrait être réversible. Une recherche dans la littérature fournit des pistes afin d'étudier cette hypothèse avec le mécanisme présenté à la figure 2.55 : ⁵⁷

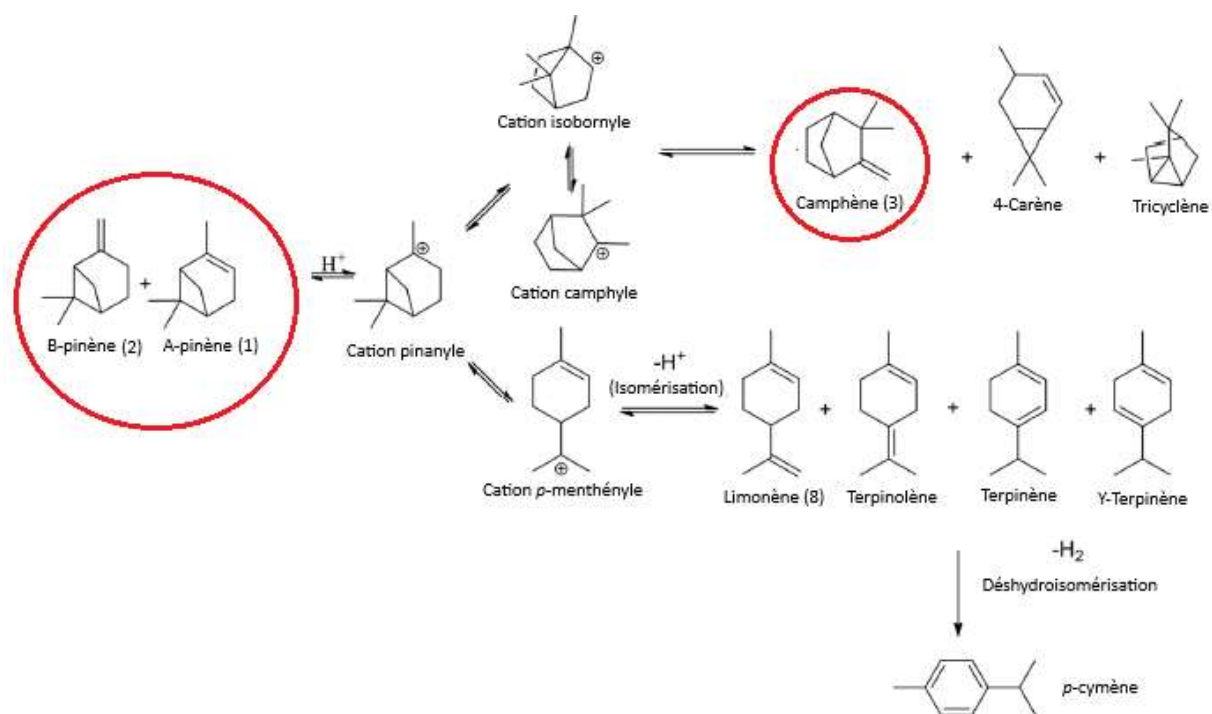


Figure 2.55 Mécanisme de l'isomérisation du α -pinène (1) et β -pinène (2) en camphène (3)

Compte tenu du mécanisme présenté précédemment, il a été supposé que le camphène (3) puisse à terme se racémiser notamment dû aux réactions réversibles impliquées, s'il est laissé dans les conditions d'isomérisation. Ceci est prédit par le mécanisme, qui propose qu'un énantiomère du camphène (3) (+ ou -) s'isomériser en β -pinène (2), qui à son tour réagira selon le mécanisme pour donner du camphène (3) racémique comme déterminé. Pour infirmer ou confirmer cette hypothèse, une masse de 10 g de camphène (3) énantiomériquement enrichi (+) à 74,4 % a été mise en contact avec le catalyseur d'isomérisation, soit les nanotubes de TiO_2 (0,5 g) à 120 °C pendant une nuit. Après ce délai, l'échantillon a été filtré pour éliminer le catalyseur et une solution 2 mg/mL dans l'heptane HPLC a été préparée pour analyse GC-FID chirale de la figure 2.56 :

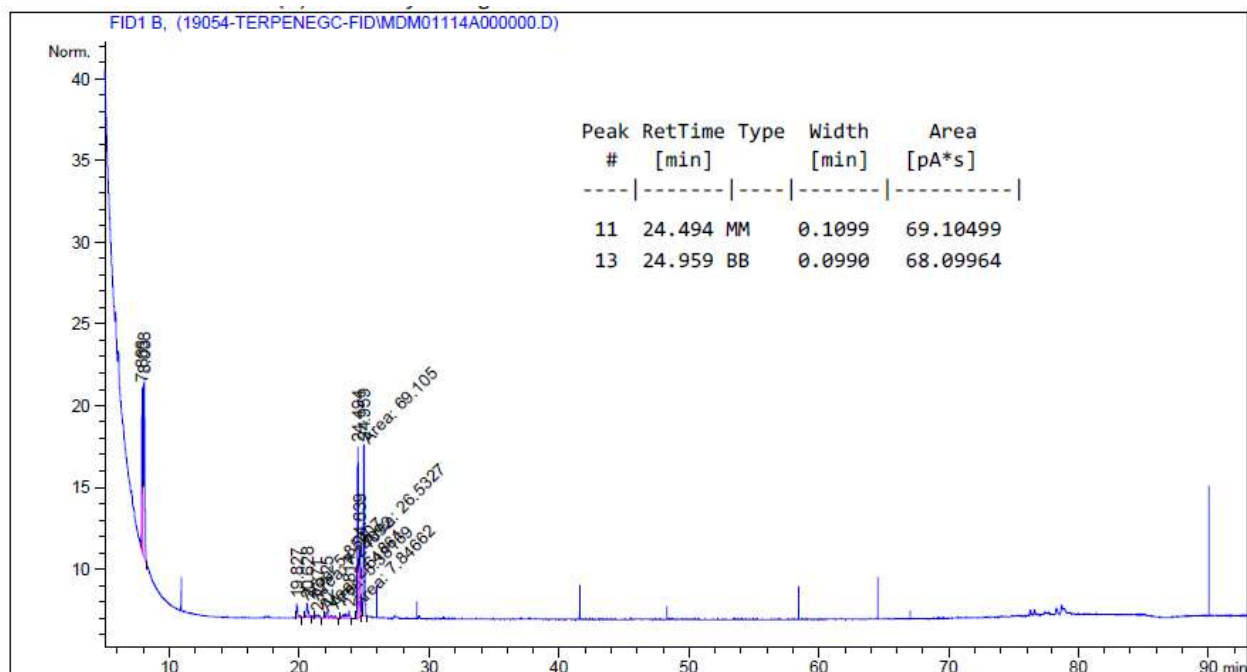


Figure 2.56 Chromatogramme de la racémisation du camphène (3)

Les intégrations résultent en une proportion de (+)-camphène (3) de 50,4 % tandis que le (-)-camphène (3) est présent à 49,6 %. Ces proportions sont celles d'un mélange racémique. L'isomérisation du β -pinène (2) au camphène (3) est conséquemment réversible, avec un équilibre favorisant la production de camphène (3), puisque du camphène (3) presque pur est obtenu durant les synthèses. Cet essai permet aussi d'ouvrir la porte à une option de racémisation du camphène (3) synthétisé, si le besoin se présentait.

Ces informations permettent d'illustrer le chemin synthétique chiral principal de l'isomérisation comme suit :

Isomérisation

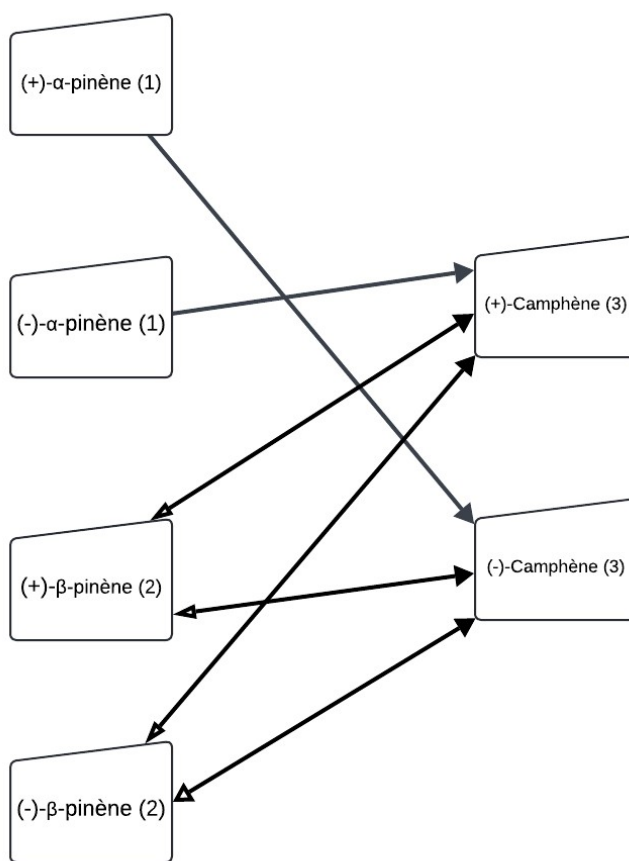


Figure 2.57 Chemin synthétique chiral principal de l'isomérisation du α -pinène (1) et β -pinène (2) en camphène (3)

Selon la figure 2.57, il est attendu que le (+)- α -pinène (1) s'isomérisise en (-)-camphène (3) tandis que le (-)- α -pinène (1) résulte en (+)-camphène (3). Dans le cas du β -pinène (2), le résultat sera toujours du camphène (3) racémique, indépendamment de la teneur énantiomérique du réactif de départ. De plus, la réaction du β -pinène (2) est plus rapide, cela étant déduit par l'absence de β -pinène (2) dans le camphène (3) synthétisé. L'énantiomère de β -pinène (2) produit par un énantiomère de camphène (3) spécifique lors de la réaction inverse est impossible à déduire, ce qui pour finir n'a pas d'impact significatif dans le cas présent étant donné que le résultat d'isomérisation des énantiomères des β -pinènes (2) sera un camphène (3) racémique et que la réaction directe est majoritaire.

2.3.2 Estérification

En deuxième lieu, l'estérification du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) a été étudiée quant à son chemin synthétique chiral. Les chromatogrammes des camphènes (3) ont déjà été obtenus à la section 1.1.4 et ces données seront utilisées pour les fins de calcul. Les chromatogrammes GC-FID chiraux du (+)-camphène (3) et du camphène (3) racémique commerciaux, sont présentés aux figures 1.21 et 1.20 respectivement. Les données extraites de ces chromatogrammes, spécifiquement les intégrations des signaux, sont résumées au tableau 2.8 :

Produit commercial	Énantiomère	Temps de rétention	Aire sous la courbe	Teneur
	(+/-)	(min)	(pA*s)	(%)
(+)-Camphène (3)	(+)	24,468	159,15097	74,4
	(-)	24,960	54,67405	25,6
Camphène (3) Racémique	(+)	24,476	131,7883	52,4
	(-)	24,946	119,8055	47,6

Tableau 2.8 Teneurs énantiomériques des camphènes (3) commerciaux

L'analyse GC-FID chirale des énantiomères commerciaux du camphène (3) confirme que le (+)-camphène (3) est énantiomèrement enrichi à 74,4 % tandis que l'énantiomère (-) constitue une proportion notable de 25,6 %. Ceci n'est pas gênant, puisqu'il sera tout de même possible d'observer l'énantiomère majoritaire de l'acétate d'isobornyle (4) obtenu par chromatographie gazeuse si la réaction est spécifique. Le camphène (3) vendu comme racémique est confirmé être racémique avec une proportion pratiquement égale des énantiomères. L'énantiomère (-) du camphène (3) n'a pu être obtenu commercialement.

Afin de procéder, le (+)-camphène (3) a été estérifié en acétate d'isobornyle (4), et ce, en présence d'acide acétique. Pour se faire, 10 g de camphène (3) ont été agités avec 2 équivalents molaires (8,83 g) d'acide acétique. Une masse de 0,5 g de catalyseur Amberlyst 15 a été ajoutée, le mélange a été agité à température ambiante et la conversion suivie par RMN. Après quatre heures, la réaction était complétée à 90 %. Un lavage aqueux pour éliminer l'acide acétique suivi d'un séchage au sulfate de sodium ont été appliqués sur la phase organique. Comme discuté à la section 1.1.4, l'acétate d'isobornyle (4) résultant ne pouvait être analysé directement par la méthode GC-FID actuelle. Le produit devait être hydrolysé en alcool selon le protocole discuté au point 1.1.4. L'ester a été hydrolysé en présence d'hydroxyde de sodium dissout dans un mélange méthanol/dichlorométhane à température ambiante selon la procédure à l'annexe A, entrée 13. Après purification, l'isobornéol (6) résultant a été dissout dans l'heptane HPLC à une concentration de 2 mg/mL pour l'analyse GC-FID chirale de la figure 2.58 :

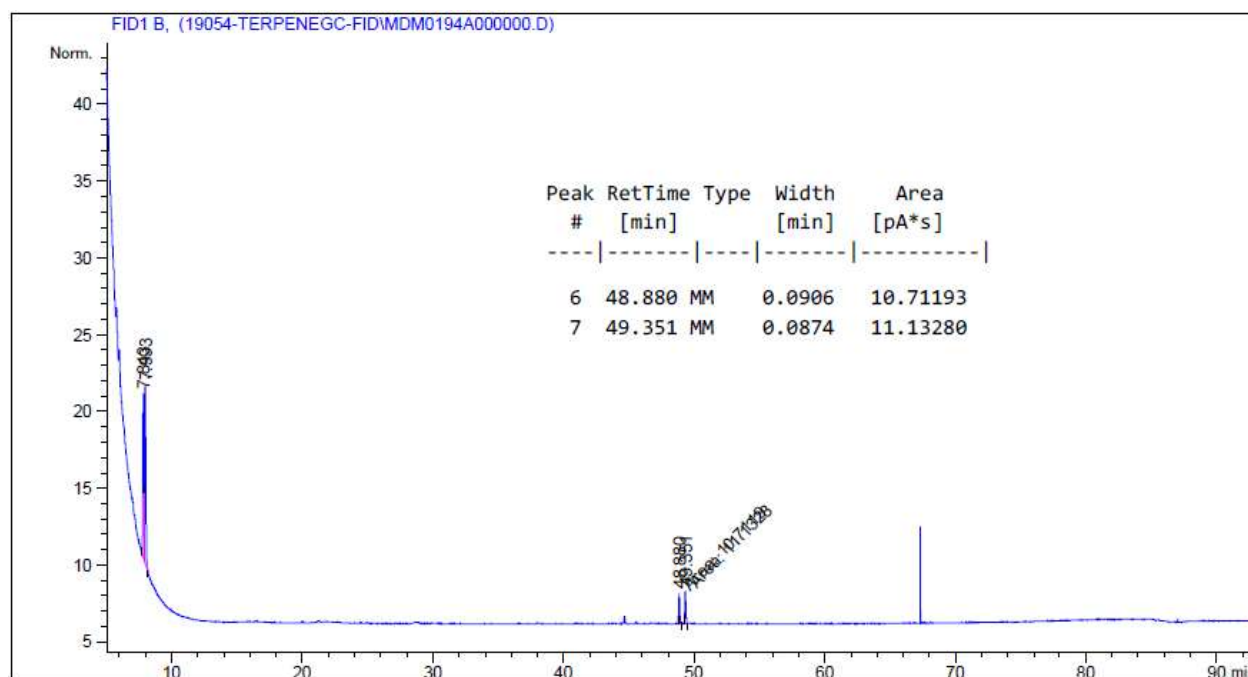


Figure 2.58 Chromatogramme de l'acétate d'isobornyle (4) hydrolysé provenant de l'estérification du (+)-camphène (3)

Le chromatogramme présente deux signaux d'aires presque égales. Il est donc conclu que l'acétate d'isobornyle (4) obtenu par estérification du camphène (3), ici observé sous sa forme hydrolysée en isobornéol (6), est racémique.

Quant au (-)-camphène (3), il n'a pu être obtenu d'une source commerciale. Cependant, une source de (-)-camphène (3) a été produite dans ce projet, notamment lors de l'isomérisation du (+)- α -pinène (1), résultant en un (-)-camphène (3) pur à 82,3 %. Cet échantillon a été estérifié suivant le même protocole que le (+)-camphène (3) estérifié précédemment, suivi d'une hydrolyse et a été analysé par la méthode GC-FID chirale dont le chromatogramme est présenté à la figure 2.59 :

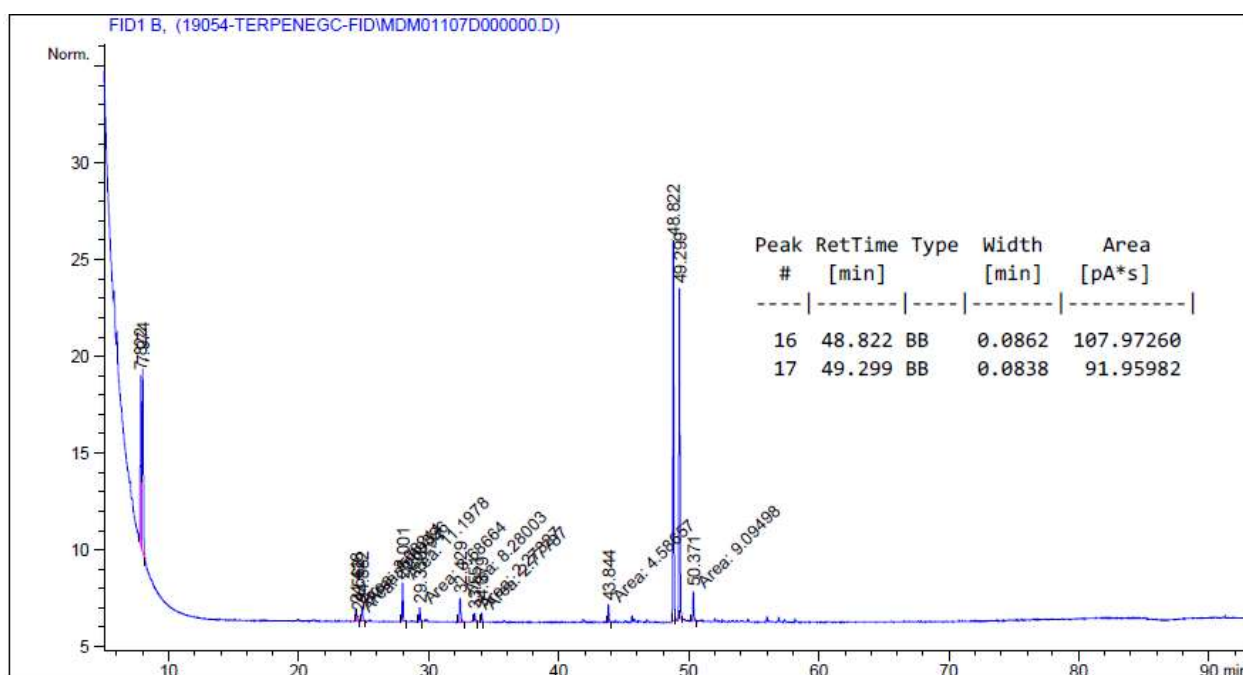


Figure 2.59 Chromatogramme de l'acétate d'isobornyle (4) hydrolysé provenant de l'estérification du (-)-camphène (3)

Les intégrations des aires sous la courbe résultent en un mélange presque égal (55 : 45) des énantiomères de l'isobornéol (6) et par conséquent, de l'acétate d'isobornyle (4). La différence entre la teneur calculée et un mélange parfaitement racémique peut être seulement due à l'intégration des signaux. Cette réaction est donc racémique, de manière identique à l'estérification du (+)-camphène (3).

Par souci de rigueur, le chromatogramme de l'acétate d'isobornyle (4) provenant de l'estérification du camphène (3) racémique, hydrolysé en isobornéol (6) selon la procédure 13 de l'annexe A pour l'analyse GC-FID chirale, est disponible à l'annexe D, section 2.3.2. Le résultat est comme prévu, un acétate d'isobornyle (4) parfaitement racémique.

Ce résultat devait être attendu selon les informations tirées de la littérature.^{76 77} En effet, un intermédiaire symétrique apparaît lors de la migration du carbocation présentée à la figure 2.33 dans lequel la charge est délocalisée entre les trois carbones, représenté à la figure 2.60 ci-contre :

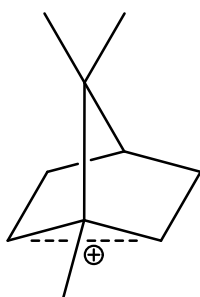


Figure 2.60 Intermédiaire symétrique du camphène (3) déprotoné

Le plan de symétrie, suivant le pont, permet à l'oxygène du carbonyle de l'acide acétique d'attaquer d'un côté ou de l'autre, sans préférence, ce qui résulte en deux molécules possibles de la figure 2.61 :

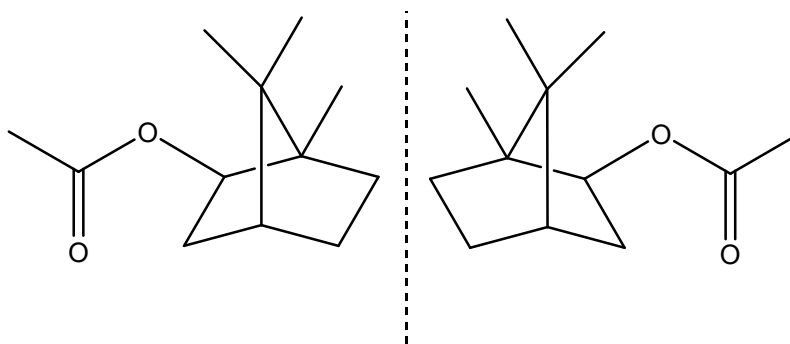


Figure 2.61 Images miroirs de l'acétate d'isobornyle (4)

Ces informations permettent de compléter le schéma à la figure 2.57 en ajoutant l'étape d'estérification :

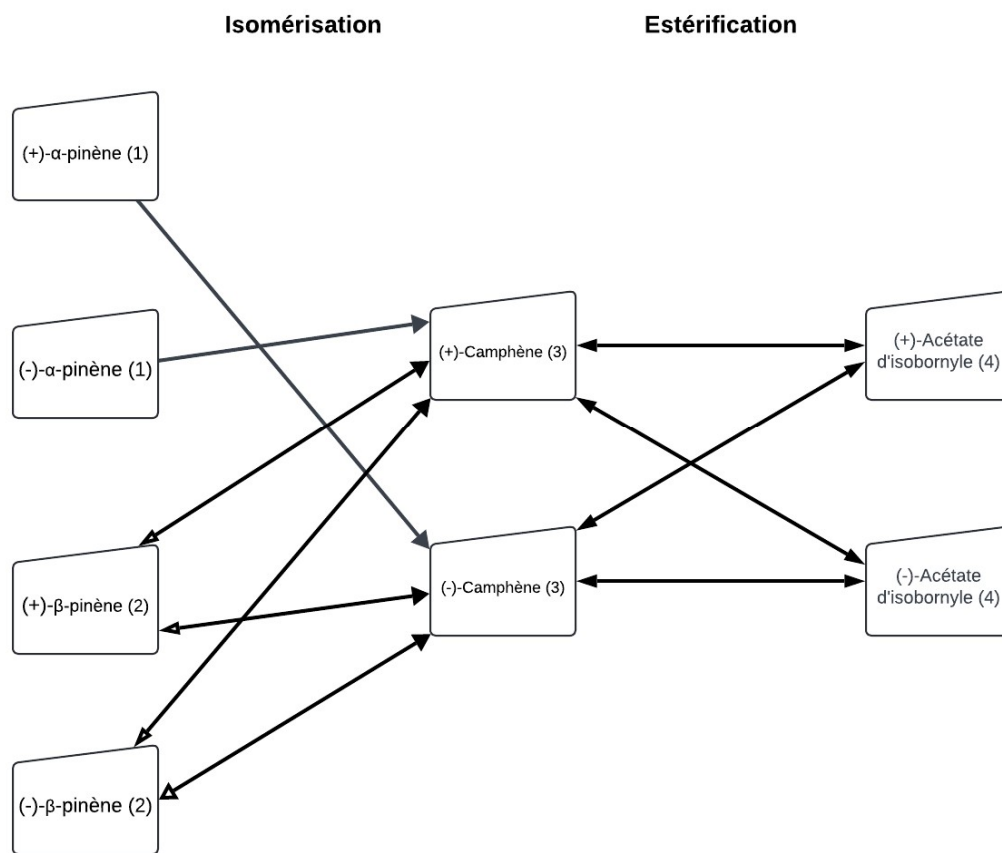


Figure 2.62 Schéma du chemin synthétique chiral des réactions étudiées

Le schéma 2.62 ci-dessus illustre le chemin synthétique chiral total de la synthèse de l'acétate d'isobornyle (4) à partir du α -pinène (1) et du β -pinène (2), en passant par le camphène (3) comme intermédiaire de réaction.⁷¹ Il est forcé de constater que toute cette étude fournit une conclusion pour le moins peu reluisante : peu importe la composition énantiomérique des α -pinènes (1) et β -pinènes (2) contenus dans la térébenthine de départ, le résultat sera toujours un acétate d'isobornyle (4) racémique. Ceci explique aussi la difficulté à sourcer les énantiomères de l'ester sur le marché, ainsi que les analyses des lots utilisés par Agrinova et dont les résultats ont été présentés à la section 1.2.3. L'avantage majeur de cette conclusion peu enivrante est que la composition énantiomérique des composés de départ n'est pas un enjeu pour une éventuelle production commerciale.

2.4 Preuve de concept

Les réactions d'isomérisation et d'estérification ont été jusqu'ici étudiées séparément en lot et en continu sous plusieurs aspects dont la température, le temps de résidence et leur catalyseur, pour ne nommer que ceux-ci. Il était maintenant temps de combiner ces connaissances afin d'exécuter le procédé, de la matière première au produit fini dans le but de prouver la faisabilité du procédé sur le plan industriel. Les travaux seront premièrement réalisés sur le α -pinène (1) et ensuite sur la térébenthine obtenue de Westrock. Le processus suivi pour cette étape débutera par l'isomérisation du réactif initial suivi de l'estérification. Entre ces réactions, ainsi qu'à l'issue du procédé, une purification par distillation sera réalisée. Afin de déterminer si celle-ci est nécessaire, la réaction sera aussi menée sans purification du début à la fin du procédé. Des analyses RMN ^1H et par GC-FID seront réalisées à chaque étape afin de caractériser le mélange réactionnel obtenu ainsi que pour calculer le rendement et la pureté.

2.4.1 α -pinène (1)

Pour les essais sur le α -pinène (1), le réactif utilisé était le produit commercial racémique, et ce dans le but de réduire les interférences possibles par les impuretés de la térébenthine. Le processus complet implique deux réactions et trois possibles purifications par distillation. Puisque la nomenclature de chaque intermédiaire peut devenir compliquée et porter à confusion au fur et à mesure que le procédé avance (ex. : estérification du α -pinène (1) isomérisé purifié), chaque étape a été identifiée par une lettre et un chiffre comme le démontre l'organigramme à la figure 2.63 où R désigne une réaction et D, une purification par distillation. Chaque étape de cet organigramme sera détaillée quant à ses conditions réactionnelles. La complétion de la réaction, le rendement et la pureté du produit obtenu seront calculés, permettant de compléter le schéma présenté. Le but de cet exercice est de fournir les données nécessaires à un industriel désirant produire l'acétate d'isobornyle (4) à partir du α -pinène (1) ou de la térébenthine. Celui-ci pourra choisir le chemin à emprunter et les étapes à réaliser selon ses équipements et ses critères de pureté.

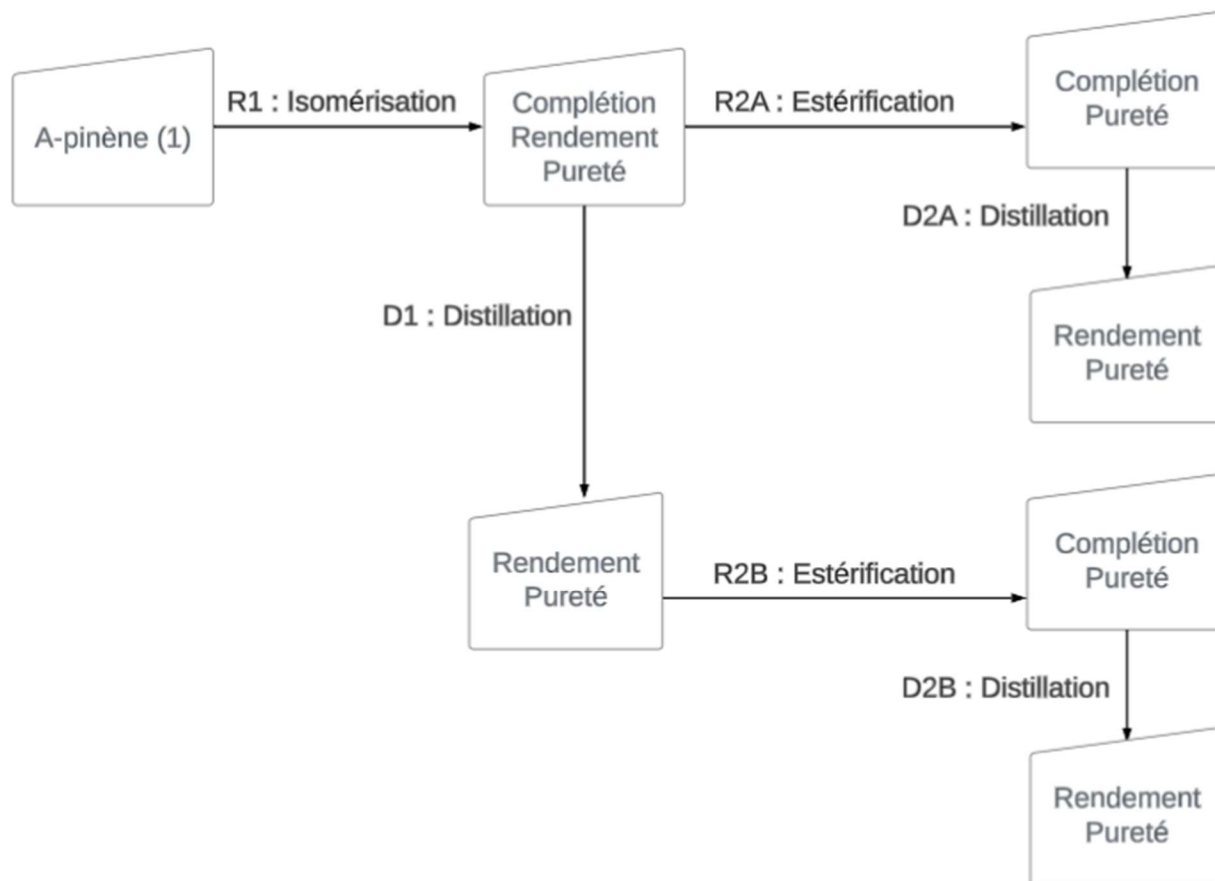


Figure 2.63 Organigramme à remplir du processus de synthèse appliqué au α -pinène (1)

La complétion de la réaction a été calculée par la disparition des signaux RMN des réactifs et l'apparition des signaux caractéristiques des produits. Le rendement représente la masse de produit récupérée à cette étape et est non cumulatif. La pureté sera calculée à partir du chromatogramme GC-FID suivant la méthode développée à la section 1.1.4. Pour ne pas surcharger le schéma, les données seront arrondies à l'unité.

Les informations relatives aux étapes sont détaillées ci-dessous :

R1: Compte tenu des complications reliées au catalyseur rencontrées à la section 2.1.4 lors de l'isomérisation en continu, cette étape a été réalisée en lot. Pour se faire, une masse de 100 g de α -pinène (1) racémique a été agitée à 140 °C avec une charge catalytique de 5 % massique des nanotubes d'oxyde de titane. Après 2 heures à cette température, le α -pinène (1) n'était plus détecté par RMN ^1H . La réaction a alors été considérée comme complétée. Le catalyseur a été filtré afin d'arrêter la réaction.

Complétion : 96 %

Rendement : 95 %

Pureté : 75 %

R2A: Le produit obtenu de R1 a été estérifié avec deux équivalents d'acide acétique et 5 % massique de charge catalytique de la résine Amberlyst 15. La réaction a été menée à 40 °C pour une durée de 6 heures. Elle a ensuite été laissée à température ambiante durant la nuit jusqu'à complétion. Le catalyseur a été filtré. La pureté obtenue ne tient pas compte de l'acide acétique présente dans le mélange réactionnel puisque ce dernier sort dans le front de solvant lors de l'analyse GC-FID.

Complétion : 95 %

Pureté : 84 %

D2A: Le produit obtenu de R2A a été distillé par distillation classique. À une température de 90 °C, la pression a été abaissée graduellement jusqu'à 11 torrs. Le résidu de distillation a été analysé pour révéler qu'il s'agissait majoritairement d'acétate d'isobornyle (4). Le rendement est calculé sur la quantité d'acétate d'isobornyle (4) attendue qu'il serait possible d'extraire par distillation. Cette valeur tient compte de la complétion de la réaction R2A et de sa pureté calculée, omettant l'acide acétique comme mentionné précédemment. La pureté est supérieure à celle calculée pour la réaction R2A, suggérant que des impuretés, dont des terpènes ou autres, ont été éliminées du produit final par la distillation.

Rendement : 90 %

Pureté : 96 %

D1 : Le produit obtenu de R1 a été distillé par distillation classique. À une température de 70 °C, la pression a été abaissée graduellement jusqu'à 9 torrs. Le distillat a été analysé pour révéler qu'il s'agissait majoritairement de camphène (3). La pureté a été obtenue par GC-FID. Pour ce qui est du rendement, la masse de distillat récupéré n'a pas été notée. La valeur du rendement présenté est celle déterminée à la section 2.1.5 lors des essais initiaux de purification. Le rendement théorique serait ici plus élevé, puisque la pureté du mélange réactionnel distillé a été évaluée à 75 % à l'étape R1.

Rendement : 55 %

Pureté : 91 %

R2B : Le produit obtenu de D1 a été estérifié avec deux équivalents d'acide acétique et 5 % massique de charge catalytique de la résine Amberlyst 15. La réaction a été menée à 40 °C pour une durée de 6 heures. Elle a ensuite été laissée à température ambiante durant la nuit jusqu'à complétion. Le catalyseur a été filtré. La pureté obtenue ne tient pas compte de l'acide acétique présente dans le mélange réactionnel puisque ce dernier sort dans le front de solvant lors de l'analyse GC-FID.

Complétion : 96 %

Pureté : 89 %

D2B : Le produit obtenu de R2B a été distillé par distillation classique. À une température de 80 °C, la pression a été abaissée graduellement jusqu'à 2 torrs. Le résidu de distillation a été analysé pour révéler qu'il s'agissait majoritairement d'acétate d'isobornyle (4). Le rendement est calculé sur la quantité d'acétate d'isobornyle (4) attendue qu'il serait possible d'extraire par distillation. Cette valeur tient compte de la complétion de la réaction R2B et de sa pureté calculée, omettant l'acide acétique comme mentionné précédemment. La pureté est supérieure à celle calculée pour la réaction R2B, suggérant que des impuretés, dont des terpènes ou autres, ont été éliminées du produit final par la distillation.

Rendement : 92 %

Pureté : 98 %

Ces données permettent de compléter l'organigramme suggéré précédemment et le résultat est présenté à la figure 2.64 :

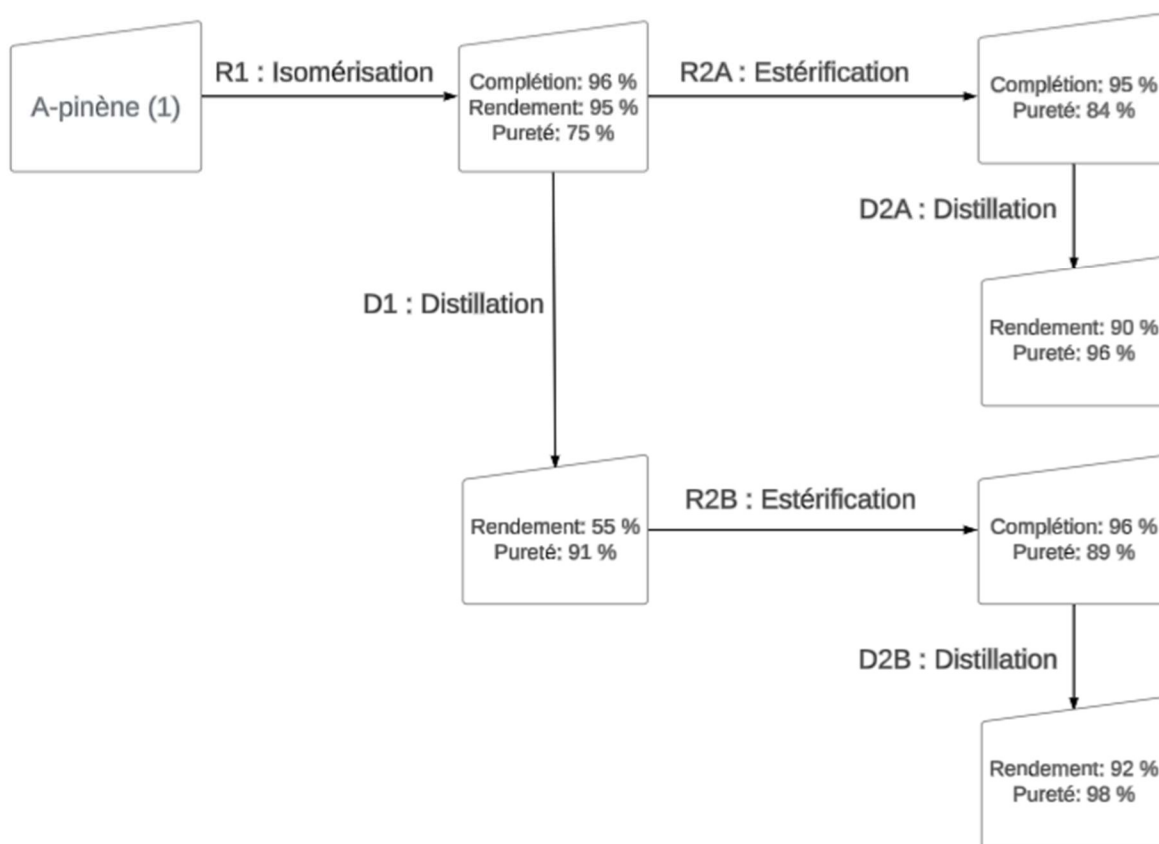


Figure 2.64 Organigramme du processus de synthèse appliqué au α -pinène (1)

Les informations obtenues à l'issue de cette étude permettent de réaliser que la distillation du produit isomérisé n'est probablement pas nécessaire lorsque le α -pinène (1) est utilisé comme réactif initial, les puretés étant similaires après les distillations R2A et R2B. Une production industrielle pourrait donc s'affranchir de cette distillation afin de produire l'acétate d'isobornyle (4) désiré. La réaction d'estérification pourrait être menée directement sur le mélange réactionnel résultant de l'isomérisation. Le chemin de synthèse à emprunter serait donc le chemin R1-R2A-D2A. Le prochain essai répètera l'étude menée sur le α -pinène (1), mais ce dernier sera remplacé par la térébenthine désodorisée obtenue dans ce projet.

2.4.2 Térébenthine

Pour la térébenthine, le même procédé a été appliqué que pour le α -pinène (1) ci-haut. Le réactif de départ était la térébenthine fournie par Westrock après désodorisation réalisée à l'échelle pilote. Sa pureté a été calculée à 85 % comme déterminé à la section 1.2.2. De la même façon que précédemment, la complétion de la réaction, le rendement massique et la pureté seront calculés afin de remplir l'organigramme. Les détails des étapes sont présentés ci-dessous :

R1 : Compte tenu des complications reliées au catalyseur rencontrées à la section 2.1.4 lors de l'isomérisation en continu, cette étape a été réalisée en lot. Pour se faire, une masse de 200 g de térébenthine a été agitée à 140 °C avec une charge catalytique de 5 % massique des nanotubes d'oxyde de titane. Après 20 heures à cette température, le α -pinène (1) n'était plus détecté par RMN ^1H . La réaction a alors été considérée comme complétée. Cette réaction était beaucoup plus lente qu'avec le α -pinène (1). La térébenthine semble avoir un effet désactivant dû à ses nombreuses molécules présentes autres que celles d'intérêt. Le catalyseur a été filtré afin d'arrêter la réaction.

Complétion : 95 %

Rendement : 95 %

Pureté : 50 %

R2A : Le produit obtenu de R1 a été estérifié avec deux équivalents d'acide acétique et 5 % massique de charge catalytique de la résine Amberlyst 15. La réaction a été menée à 40 °C pour une durée de 5 heures. Elle a ensuite été laissée à température ambiante durant la nuit jusqu'à complétion. Le catalyseur a été filtré. La pureté obtenue ne tient pas compte de l'acide acétique présente dans le mélange réactionnel puisque ce dernier sort dans le front de solvant lors de l'analyse GC-FID.

Complétion : 95 %

Pureté : 56 %

D2A: Le produit obtenu de R2A a été distillé par distillation classique. À une température de 116 °C, la pression a été abaissée graduellement jusqu'à 15 torrs. Le résidu de distillation a été analysé pour révéler qu'il s'agissait majoritairement d'acétate d'isobornyle (4). Le rendement est calculé sur la quantité d'acétate d'isobornyle (4) attendue qu'il serait possible d'extraire par distillation. Cette valeur tient compte de la complétion de la réaction R2A et de sa pureté calculée, omettant l'acide acétique comme mentionné précédemment. La pureté est supérieure à celle calculée pour la réaction R2A, suggérant que des impuretés, dont des terpènes ou autres, ont été éliminées du produit final par la distillation.

Rendement : 83 %

Pureté : 95 %

D1: Le produit obtenu de R1 a été distillé par distillation classique. À une température de 70 °C, la pression a été abaissée graduellement jusqu'à 18 torrs. Le distillat a été analysé pour révéler qu'il s'agissait majoritairement de camphène (3). La pureté a été obtenue par GC-FID et le rendement est la quantité de camphène (3) récupérée sur la quantité qu'il était possible d'obtenir selon la pureté du mélange distillé.

Rendement : 66 %

Pureté : 67 %

R2B: Le produit obtenu de D1 a été estérifié avec deux équivalents d'acide acétique et 5 % massique de charge catalytique de la résine Amberlyst 15. La réaction a été menée par la chimie en continu à un débit de 0,1 ml/min, ce qui correspond à un temps de résidence de 20 minutes. La température de la première colonne était contrôlée à 40 °C tandis que la deuxième colonne reposait dans un bain d'eau à 20 °C. Lorsque le système était dans son état stable, le mélange réactionnel a été récolté. La pureté obtenue ne tient pas compte de l'acide acétique présente dans le mélange réactionnel puisque ce dernier sort dans le front de solvant lors de l'analyse GC-FID.

Complétion : 95 %

Pureté : 87 %

D2B: Le produit obtenu de R2B a été distillé par distillation classique. À une température de 90 °C, la pression a été abaissée graduellement jusqu'à 10 torrs. Le résidu de distillation a été analysé pour révéler qu'il s'agissait majoritairement d'acétate d'isobornyle (4). Le rendement est calculé sur la quantité d'acétate d'isobornyle (4) attendue qu'il serait possible d'extraire par distillation. Cette valeur tient compte de la complétion de la réaction R2B et de sa pureté calculée, omettant l'acide acétique comme mentionné précédemment. La pureté est supérieure à celle calculée pour la réaction R2B, suggérant que des impuretés, dont des terpènes ou autres, ont été éliminées du produit final par la distillation.

Rendement : 87 %

Pureté : 95 %

Avec les informations présentées précédemment, il est possible de remplir un organigramme identique à celui construit pour le α -pinène (1) à la figure 2.64 :

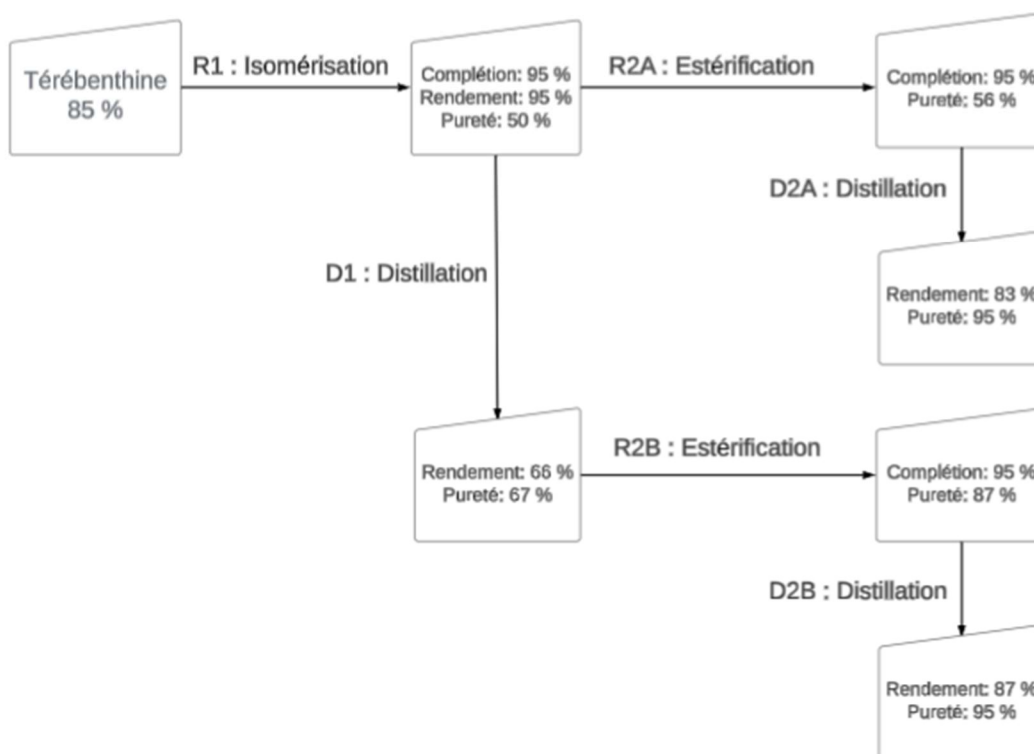


Figure 2.65 Organigramme du processus de synthèse appliqué à la térébenthine

La figure 2.65 fait état du processus développé appliqué à la matière première qui serait réellement utilisée soit la térébenthine issue de l'industrie des pâtes et papier. Il est à noter que la pureté du processus R1-R2A chute assez drastiquement avant sa purification en D2A. Même la distillation en D1 ne réussit pas à augmenter la pureté au-delà de 67 %. Ceci est probablement dû à la présence des produits d'isomérisation qui ont des points d'ébullition similaires à celui du camphène (3). La recommandation serait alors de procéder avec l'estérification et ne distiller qu'une seule fois à la toute fin. L'élimination d'une étape de distillation réduit l'effort nécessaire pour obtenir un produit tout aussi pur à l'issue du procédé. En termes d'équipements, c'est aussi un système de distillation en continu en moins que l'industriel devra acquérir. C'est une bonne nouvelle quant aux coûts nécessaires à la production d'acétate d'isobornyle (4) à l'échelle industrielle. Cet exercice a aussi permis de démontrer la faisabilité du processus développé lorsqu'il est appliqué à la térébenthine plutôt qu'à un réactif commercialement disponible et purifié. Finalement, un kilo de térébenthine désodorisée résulte en 0,67 kg d'acétate d'isobornyle (4) selon les rendements cumulatifs.

2.5 Évaluation des coûts de production

Armé des études complètes sur les réactions en lot et en continu, les quantités en jeu, les purifications nécessaires et la chiralité en résultant, il ne demeure plus qu'une question centrale : Ce procédé est-il économiquement viable et comment l'acétate d'isobornyle (4) synthétisé se compare-t-il au produit actuellement utilisé soit le chlorprophame (CIPC) sur la base du prix ? Il est possible d'y répondre en évaluant les coûts de production. Étant donné qu'une étude technico-économique complète s'avère être un travail de plusieurs mois et implique des compétences dépassant la portée du présent travail, les aspects étudiés se limiteront aux intrants. Puisque le coût associé au traitement antigerminatif est habituellement calculé par rapport à la masse de pommes de terre à traiter, la valeur sera ramenée en masse de produit nécessaire pour traiter une tonne de tubercules. La valeur obtenue sera comparée à celle du CIPC pour le marché actuel, aussi exprimée en masse de produit par tonne de pommes de terre.

2.5.1 Recherche des prix industriels

La première étape consistait à obtenir le prix, en grand format, des réactifs nécessaires aux synthèses. Cet effort a été fourni en majeure partie par un de nos partenaires industriels dans le projet soit Sani-Marc. Leurs contacts et leur plus grand pouvoir d'achat auprès des fournisseurs permettent d'obtenir des prix plus réalistes et avantageux. Les prix obtenus ont été complétés par d'autres fournisseurs contactés par l'équipe de projet ou encore, le cas échéant, par une estimation selon un prix datant de quelques années.

Les trois étapes, soit celle de la désodorisation, de l'isomérisation et de l'estérification ont été considérées dans cette étude. Les produits et les prix obtenus dans différents formats sont ceux du tableau 2.9 suivant :

Étape	Réactif	Fournisseur	Grade	Format	Prix
					(\$ CAD/kg)
Désodorisation	Térébenthine brute	Westrock	N/A	Tonne	3,00
	Hypochlorite de sodium	Sani-Marc	12 %	Tonne	1,15
Isomérisation	Oxyde de titane	N/D	Technique, Rutile	Tonne	5,00
	Hydroxyde de sodium	Sani-Marc	99 %	Tonne	1,75
	Acide chlorhydrique	Sani-Marc	Concentré, ACS	Citerne	0,60
Estérification	Acide acétique	Sani-Marc	Glacial, Food grade	Citerne	2,40
	Résine Amberlyst 15 dry	Sani-Marc	N/A	Baril 100 kg	142,00

Tableau 2.9 Réactifs et prix associés pour la synthèse de l'acétate d'isobornyle (4)

Les prix ont en majorité été obtenus par le partenaire industriel Sani-Marc. Lorsque les produits n'étaient pas tenus par les fournisseurs habituels de celui-ci, une recherche de prix a été réalisée par l'équipe de projet. Pour la térébenthine brute, le prix vient directement du producteur Westrock, papetière située à La Tuque, Québec. C'est leur prix actuel de vente pour ce produit. Pour l'oxyde de titane (TiO₂), des prix en grands formats n'ont pas été obtenus directement. Ce coût de 5.00 \$/kg est une estimation faite à partir des coûts payés par un partenaire industriel en 2020. Une majoration de 20 % a été appliquée pour pallier l'inflation depuis ces cinq années. Finalement, la résine catalytique Amberlyst 15 étant plutôt un produit de niche, elle pouvait être fournie en baril de 100 kg à raison de 142,00 \$/kg ou encore en sacs de 470 kg à raison de 130,00 \$/kg. Puisque cette résine est catalytique et que seulement quelques kilos sont nécessaires à la fois, la première option a été retenue pour ne pas utiliser un lot sur une grande période et risquer une dégradation de la résine. Ces prix permettent de procéder avec le calcul du coût de production de l'acétate d'isobornyle (4).

2.5.2 Calcul du coût de production de l'acétate d'isobornyle (4)

Les données obtenues précédemment tant pour les prix à la section 2.5.1 que pour les données d'équivalents, de charge catalytique et de rendement aux sections 2.1 et 2.2 seront ici combinées dans le but de calculer le coût des intrants afin d'obtenir 1 kg d'acétate d'isobornyle (4). Pour les étapes ci-dessous, les quantités d'intrants seront calculées et leur coût associé sera évalué :

- Désodorisation de la térébenthine (section 1.3)
- Confection des nanotubes de TiO₂ (section 2.1.1)
- Isomérisation des pinènes (1 et 2) en camphène (3) (section 2.1)
- Estérification du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) (section 2.2)

Pour fin de simplicité, il sera assumé que la désodorisation et la confection des nanotubes ont des rendements de 100 %. Pour l'isomérisation, un rendement de 55 % avait été obtenu et c'est cette donnée qui sera utilisée, même si le rendement théorique est de 65,09 %. Quant à l'estérification, le rendement calculé de 89,68 % doit être ajusté en fonction de la pureté qui est de 96,08 % pour la purification par distillation. Le rendement global de 86,16 % sera arrondi à 85 %. Pour cette étude, plusieurs suppositions ont été posées afin de simplifier les calculs et seront discutées à la suite de la présentation des résultats :

- L'excédent d'hypochlorite de sodium est considéré comme perdu.
- Les charges catalytiques appliquées ont été choisies selon les limites déterminées aux sections précédentes.
- Les catalyseurs sont considérés non régénérables et non réutilisables.
- L'équivalent d'acide acétique est considéré comme non récupérable, malgré qu'il soit possible de le condenser et de le réinjecter dans le procédé comme démontré à la section 2.2.3. Il en va de même pour le camphène (3) non réagi lors de l'estérification.
- Les différences mineures entre les chiffres proviennent de l'arrondissement des données

Lorsque le coût du produit désiré sera déterminé, une comparaison de la contribution de chaque intrant au prix total sera réalisée. Cette étape permet de visualiser l'impact de chaque intrant et si le prix devait être abaissé afin d'être compétitif, il serait judicieux de débiter par l'optimisation du plus grand contributeur. Finalement, une estimation du coût réel incluant les dépenses d'exploitation (OPEX) et les dépenses d'investissements (CAPEX) sera obtenue. Cette valeur se rapprochant davantage de la réalité

lors d'une production industrielle sera utilisée pour évaluer le coût en acétate d'isobornyle (4) nécessaire pour traiter une tonne de pommes de terre en entrepôt. C'est habituellement sous cette formule, un coût selon la masse de pommes de terre à traiter, que les contrats de traitement sont rédigés. Si les données sont disponibles, une comparaison avec les produits couramment utilisés et idéalement avec le CIPC sera effectuée afin de vérifier la compétitivité du procédé développé.

Premièrement, les étapes de désodorisation, de fabrication des nanotubes et d'isomérisation ont été rassemblées au tableau 2.10 :

Isomérisation						
		Désodorisation		Nanotubes TiO ₂		
Élément	Unité	Térébenthine	NaClO	TiO ₂	NaOH	HCl
Prix de vente	(\$/kg)	3,00	1,15	5,00	1,75	0,60
Masse utilisée	(kg)	1,00	0,958	0,05	0,80	0,0083
Coût	(\$)	3,00	1,10	0,25	1,40	0,005

Tableau 2.10 Calcul des intrants pour la désodorisation, la confection des nanotubes de TiO₂ et l'isomérisation

Comme démontré à la section 1.3, la désodorisation d'un kilo de térébenthine brute nécessite environ 0,958 kg d'hypochlorite de sodium. Cette térébenthine propre est ensuite soumise à l'isomérisation sous les conditions déterminées en présence des nanotubes d'oxyde de titane. Ceux-ci nécessitent 0,80 kg d'hydroxyde de sodium pour 50 g d'oxyde de titane. Ils doivent ensuite être lavés avec de l'acide chlorhydrique dilué, nécessitant 0,0083 kg d'acide concentré. La totalité de la charge de 5 % m/m déterminée à la section 2.1 est considérée être consommée par la réaction d'isomérisation. Des travaux futurs pourraient potentiellement augmenter la réactivité, abaissant la charge nécessaire. De plus, il est supposé que les nanotubes usés pourraient être nettoyés et réactivés avec un lavage acide. Le camphène (3) est ensuite purifié par distillation. Les coûts totaux sont présentés au tableau 2.11 suivant :

Isomérisation		
Élément	Unité	Valeur
Coût en intrants	(\$)	5,76
Rendement	(kg)	0,55
Coût du camphène (3)	(\$/kg)	10,47

Tableau 2.11 Coûts pour synthétiser 1 kg de camphène (3)

Les masses d'intrants présentées au tableau précédent totalisent un coût de 5,76 \$. En tenant compte du rendement de 55 %, c'est un coût de 10,47 \$ par kilo de camphène (3) synthétisé qui est obtenu. Ensuite, ce coût du camphène (3) a été inséré dans les calculs portant sur l'estérification et la résultante est présentée au tableau 2.12 :

Estérification				
Élément	Unité	Camphène (3)	Acide acétique	Amberlyst 15
Prix de vente	(\$/kg)	10,47	2,40	142,00
Masse utilisée	(kg)	1,00	0,8838	0,0039
Coût	(\$)	10,47	2,12	0,56

Tableau 2.12 Calcul des intrants pour l'estérification du camphène (3).

Comme déterminé à la section 2.2, deux équivalents d'acide acétique sont utilisés pour mener la réaction. En masse, c'est 0,8838 kilo d'acide acétique qui devrait être ajouté par kilo de camphène (3) pour former le mélange réactionnel. La masse utilisée de catalyseur provient de la capacité de conversion déterminée à la section 2.2.2 où il a été calculé que 255 kg de camphène (3) pouvaient être estérifiés par kilo de résine acide employée. La valeur inscrite provient de cette capacité, ramenée sur un kilo de camphène (3) à transformer. Le catalyseur Amberlyst 15 est ici aussi considéré comme non récupérable, bien que des travaux pourraient réussir à le régénérer.⁷⁸ Les coûts sont additionnés et ajustés selon le rendement massique obtenu pour obtenir le prix au kilogramme du tableau 2.13 :

Élément	Unité	Valeur
Coût en intrants	(\$)	13,14
Rendement	(kg)	1,224
Coût de l'acétate d'isobornyle (4)	(\$/kg)	10,74

Tableau 2.13 Coûts pour synthétiser 1 kg d'acétate d'isobornyle (4)

Les coûts additionnés provenant du tableau précédent totalisent 13,14 \$ pour estérifier 1 kg du camphène (3) synthétisé. Puisque chaque kilo de camphène (3) estérifié résulte en 1,44 kg d'acétate d'isobornyle (4) dû au groupement acétate greffé et en tenant compte du rendement de 85 %, c'est 1,224 kg d'acétate d'isobornyle (4) qui est réellement isolé après distillation. Ramené sur 1 kg d'acétate de bornyle (5), c'est donc 10,74 \$ qui serait nécessaire en intrants pour synthétiser ce produit. Ici, le camphène (3) et l'acide acétique distillés sont considérés comme non récupérables, mais il a été démontré qu'avec un système industriel de condensation efficace, il serait possible de les récupérer et de les réinjecter dans le procédé, abaissant davantage le coût de l'acétate d'isobornyle (4) synthétisé.

En tenant compte des coûts de chaque réactif et des rendements respectifs des réactions, il est possible d'obtenir la contribution de chaque intrant sur le total du coût de production de l'acétate d'isobornyle (4) :

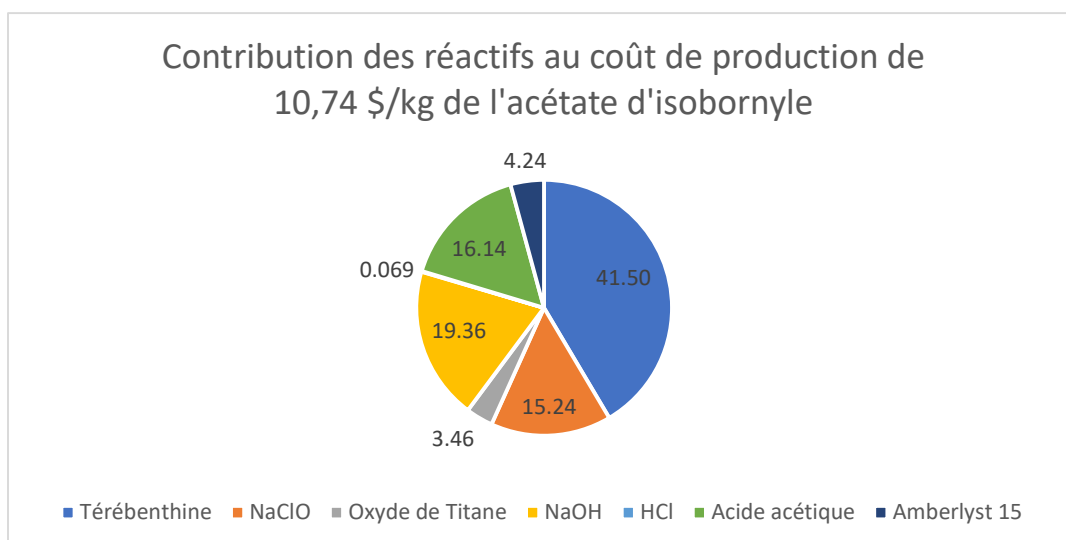


Figure 2.66 Contribution des intrants au coût de production de l'acétate d'isobornyle (4)

À la figure 2.66, le diagramme permet de visualiser la contribution de chaque intrant au coût total de production de l'acétate d'isobornyle (4). Les plus grandes contributions proviennent de la térébenthine de départ à 41,50 %, suivie de l'hydroxyde de sodium utilisé pour la confection des nanotubes à 19,36 %, de l'acide acétique à 16,14 % et ensuite de l'hypochlorite de sodium nécessaire à la désodorisation à 15,24 %. Plusieurs leviers s'offrent afin d'abaisser le coût total de production. Par exemple, si le prix de l'acétate d'isobornyle (4) devait être abaissé pour améliorer sa compétitivité versus le CIPC ou tout autre traitement actuel, c'est sur le coût d'achat de la térébenthine que le travail devrait être concentré. La concentration d'hydroxyde de sodium utilisée lors de la confection des nanotubes gagnerait à être optimisée. Ensuite, comme mentionné précédemment, l'équivalent en excès d'acide acétique pourrait être récupéré, ce qui abaisserait sa contribution au coût de moitié. Finalement, l'hypochlorite de sodium utilisé lors de la désodorisation de la térébenthine pourrait être réduit ou réutilisé. La résine Amberlyst 15, l'oxyde de titane et l'acide chlorhydrique ne représentent respectivement que 4,24 %, 3,46 % et 0,069 % du coût total. Ceci signifie que déployer des efforts pour réduire le coût de ces produits ne serait pas grandement avantageux pour le coût de production, même si la résine Amberlyst se détaille au prix le plus haut des réactifs impliqués à 142 \$/kg.

2.5.3 Comparaison aux traitements existants

En plus du coût des intrants, il faut considérer plusieurs autres aspects lors de la production d'une entité moléculaire industriellement. Notamment, les salaires, les coûts énergétiques, l'immobilisation des valeurs des immeubles et des équipements et les marges de profit sont tous des facteurs qui entrent dans le calcul lors de la détermination du prix de vente d'un produit industriel de quelque nature. Les données relatives à ces aspects ont été prélevées d'un travail réalisé par l'équipe de projet. Ces données évaluées par les partenaires de recherche Innofibre, Kemitek, Agrinova et Transbiotech sont présentées telles quelles au tableau 2.14 :

Poste budgétaire	Valeur	Unité
Production d'acétate d'isobornyle (4)	500000	kg/an
Matières premières	10,74	\$/kg
Coûts annuels en matières premières	5370000	\$/an
OPEX - Salaires (8 opérateurs et 2 administrateurs)	800000	\$/an
OPEX - Coûts énergétiques	300000	\$/an
CAPEX - équipements (Amortissement de 5 millions sur 10 ans)	500000	\$/an
CAPEX - bâtiment (Amortissement de 5 millions sur 30 ans)	166667	\$/an
Dépenses totales	7136667	\$/an
Coût pour une production locale	14,27	\$/kg
Marge de profit (Produit chimique de spécialité) ⁷⁹	33	%
Coût pour une production locale + Marge de profit	18,98	\$/kg
Coût de l'acétate d'isobornyle (4) sur le marché asiatique	18,60-21,40	\$/kg

Tableau 2.14 Coût de production annuelle de l'acétate d'isobornyle (4)

Ce tableau liste les principales dépenses reliées à une production de 500 000 kg d'acétate d'isobornyle (4) par une entreprise. Les notions de CAPEX et OPEX s'y retrouvent afin d'estimer le coût d'une production annuelle et le prix de vente subséquent. Le coût de 10,74 \$/kg déterminé plus haut est ajusté selon les salaires, le coût en énergie ainsi que les amortissements du bâtiment et des équipements nécessaires, résultant en un coût de 14,27 \$/kg. Une marge de profit de 33 %, la marge moyenne pour les industries de produits chimiques de spécialité, a été assumée et appliquée pour un prix de vente de 18,98 \$ par kilogramme d'acétate d'isobornyle (4). Comparativement au produit sur les marchés asiatiques des distributeurs tels que Alibaba, le coût de 18,98 \$ se trouve dans le quart bas de la fourchette. Ce coût est donc très comparable et encourageant pour un producteur potentiel.

En tout dernier lieu et afin de clore ce volet, une comparaison avec le prix courant du produit visant à être remplacé, soit le chlorprophame (CIPC) s'imposait, bien que l'acétate d'isobornyle (4) puisse ne pas être un remplaçant direct selon son mode d'action. Ceci sera déterminé par l'étude de son mécanisme, réalisé par une étudiante affiliée à ce projet. Selon des documents produits par le Centre de référence en agriculture et en agroalimentaire du Québec (CRAAQ), le coût en CIPC par tonne de pommes de terre à traiter en 2019 était évalué à 4,00 \$.⁸⁰ Selon les calculateurs de la Banque du Canada, ces quatre dollars équivalent à 4,83 \$ en 2025 une fois l'inflation prise en compte.⁸¹ À la suite de tests en entrepôt, le partenaire Agrinova a déterminé que la concentration de produit à utiliser était de 200 ppm afin de traiter efficacement les germes, tout en évitant la phytotoxicité ou l'empoisonnement du tubercule par l'acétate d'isobornyle (4). Suivant cette concentration, c'est donc 0,2 kg d'acétate d'isobornyle (4) qui est nécessaire pour traiter une tonne de pommes de terre entreposées. Cette masse d'esters selon le prix établi plus haut se détaillerait donc à 3,80 \$. Il en revient alors à 3,80 \$ par tonne de pommes de terre à traiter. Ceci est très comparable au prix du CIPC en 2025 précédemment déterminé. Les producteurs auraient donc tout avantage à incorporer l'acétate d'isobornyle (4) dans leur programme de lutte contre la germination des pommes de terre durant leur stockage afin d'abaisser leur coût et de rendre cet aspect de leurs opérations plus vert et écoresponsable.

Au terme des travaux de ce chapitre, les réactions impliquées ont été étudiées et les conditions réactionnelles optimales ont été déterminées. L'isomérisation du α -pinène (1) au camphène (3) était optimalement menée à 140 °C avec un temps de réaction de 3,5 heures en lot sous une charge catalytique de 5 %. Le catalyseur optimal était les nanotubes d'oxyde de titane faits à partir d'oxyde de titane anatase et lavés à l'acide chlorhydrique 0,5 mol/L. En continu, un temps de résidence d'environ 60 minutes était nécessaire à la même température. Le rendement obtenu pour cette réaction, en tenant compte de la complétion est de 71 %. Cependant, l'activité catalytique des nanotubes diminuait rapidement, probablement dû à un empoisonnement des sites catalytiques. De plus amples travaux seraient nécessaires afin de régler cette problématique. Quant à l'estérification du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4), la réaction catalysée par la résine commerciale Amberlyst 15 en présence de deux équivalents d'acide acétique se déroulait optimalement à 40 °C. Cependant, une baisse de température à 20 °C était nécessaire afin de déplacer l'équilibre vers les produits et d'obtenir un rendement au-delà de 90 %. Ce processus réalisé en continu nécessitait un temps de contact total de 10 minutes. Le chemin synthétique chiral a aussi été exploré. Ultiment, peu importe la composition énantiomérique en α -pinène (1) et β -pinène (2) de la térébenthine de départ, l'acétate d'isobornyle (4) obtenu serait toujours

racémique. Ceci est un résultat de la réaction d'estérification du camphène qui est racémisante. Une preuve de concept a ensuite été réalisée afin de démontrer la faisabilité du procédé synthétique et de ses étapes. La térébenthine désodorisée peut être isomérisée en camphène (3) sans purification subséquente, estérifiée en acétate d'isobornyle (4) pour finalement subir une unique distillation. Une pureté au-delà de 95 % a été obtenue. Le cumulatif des rendements a démontré qu'un kilogramme de térébenthine est transformé en 0,67 kilogramme d'acétate d'isobornyle (4). Finalement, les coûts de production de cette molécule suivant le procédé développé ont été calculés. Le coût de production en intrants s'élève à 10,74 \$/kg d'acétate d'isobornyle (4). L'ajout des autres dépenses hypothétiques reliées à la production telles que le bâtiment, l'énergie, les ressources humaines et une marge de profit de 33 % gonfle ce coût à 18,98 \$/kg. Comparativement au prix du produit sur le marché asiatique variant de 18,60 \$/kg à 21,40 \$/kg, ce coût est tout à fait réaliste et industriellement compétitif.

À ce stade, les travaux sur l'agent antigerminatif soit l'acétate d'isobornyle (4) étaient achevés. Cependant, les pommes de terre sont sujettes à des maladies de nature bactérienne en plus de la germination hâtive lors de leur stockage prolongé. L'équipe de projet ayant déjà débuté les travaux à ce sujet, cette étude a aussi porté sur un traitement antimicrobien protégeant les tubercules obtenus à partir des écorces d'épinette noire « *Picea Mariana* ».

CHAPITRE 3

Traitement antimicrobien : Identification, extraction et évaluation

Dans ce chapitre, un traitement antimicrobien pour les pommes de terre durant le stockage sera développé. Premièrement, un extrait possédant une activité antimicrobienne notable et issu de la biomasse forestière sera fractionné sur colonne de silice afin d'être étudié quant à sa composition. L'efficacité antimicrobienne de chaque fraction sera mesurée et les fractions actives seront réservées pour des études plus poussées. Deuxièmement, le processus de production de cet extrait sera optimisé afin d'éliminer les désavantages majoritaires rencontrés tout en s'assurant que la nouvelle méthode produit un échantillon actif envers les microorganismes causant les maladies sur les pommes de terre. Finalement, l'étude technico-économique du procédé développé sera menée sur plusieurs facettes afin de mettre en lumière les avantages ou inconvénients de ce dernier. Une recommandation sera alors émise quant au choix du procédé selon les informations recueillies.

3.1 Identification de l'agent antimicrobien par séparation bioguidée

Comme mentionné en introduction, les pertes de pommes de terre enregistrées lors de leur stockage sont aussi dues aux maladies provoquant la pourriture molle. Celles-ci peuvent être évitées ou retardées par l'application de traitements contenant des agents antimicrobiens commercialement disponibles. Le projet consistait aussi à produire un tel agent antimicrobien à partir de la biomasse forestière. Cette production a été réalisée par le partenaire Innofibre. Il demeurerait, même après constatation que l'extrait produit était actif pour l'inhibition des maladies provoquant la pourriture, que les ingrédients actifs étaient toujours inconnus. Il a donc été envisagé d'analyser cet extrait pour en connaître ses constituants. Ce procédé de déformulation est une tâche monumentale dans la plupart des cas et l'analyse directe, par quelque technique que ce soit, est impossible. En effet, des dizaines, voire des centaines de molécules peuvent constituer un extrait issu de l'écorce d'épinette noire. Un fractionnement de cet extrait s'imposait pour simplifier le processus d'identification. La technique sélectionnée était le fractionnement dit bioguidé par colonne de silice. Ce fractionnement débute par une séparation sur colonne de silice hydrophobe classique suivie de l'analyse antimicrobienne des fractions obtenues. Ensuite, les fractions identifiées comme actives seraient repassées afin de les fractionner à nouveau. Les sous-fractions obtenues seraient envoyées pour analyse antimicrobienne. Ce cycle de fractionnement-analyse serait répété jusqu'à ce qu'aucune des fractions analysées ne soit active envers les microorganismes étudiés. Ces itérations permettraient d'identifier quelle(s) sous-fraction(s) possèdent les propriétés antimicrobiennes désirées.

3.1.1 Séparation bioguidée

Ayant accès à un système de séparation automatisée sur colonne de silice (Annexe A, # 7), cet appareil a été choisi afin d'augmenter grandement la productivité et réduire le travail comparativement à une séparation sur colonne de silice classique en chimie. En plus d'exécuter un programme d'élution en variant les proportions de solvants qui sont injectées dans la colonne, ce système de Biotage permet d'analyser, en ligne, les fractions qui en ressortent et de les séparer selon des paramètres prédéfinis. La colonne utilisée était en phase inverse, constituée de particules sphériques de silice sur laquelle sont greffées des chaînes de dix-huit carbones communément appelées « C-18 ». La détection est faite par détecteur UV-Visible et le signal total entre 198 et 810 nm a été sélectionné, plutôt que des longueurs d'onde étroites. Le seuil de détection a été configuré à 40 mAU (milliunités d'absorbance) afin de récolter le plus de fractions possibles. Tout ce qui se trouve au-dessous du seuil de détection est automatiquement rejeté par l'appareil et est considéré faire partie du bruit de fond. Les solvants choisis étaient le méthanol et l'eau qui elle contenait 0,1 % d'acide formique. Ceci était ajouté dans le cas où un détecteur par ionisation serait utilisé afin de faciliter l'ionisation, ce qui ultimement ne fut pas le cas. De plus, un pH légèrement acide assure que les acides ou alcools soient protonés, ce qui aide à amincir les pics obtenus et uniformiser leur temps de rétention. Le programme d'élution est calculé en CV ou « volume de colonne ». Le volume disponible dans une colonne spécifique étant connu par l'appareil, il est plus simple d'ouvrir une valve chronométrée si on respecte un débit constant. Le programme d'élution est présenté au tableau 3.1 :

Solvants : Méthanol/Eau + 0,1 % acide formique		
Plateau	Proportion de méthanol (%)	Volume de solvant injecté (CV)
1	10	3
2	20	6
3	30	7
4	40	6
5	50	4
6	60	4
7	70	3
8	100	5

Tableau 3.1 Programme d'élution de la séparation bioguidée

Sommairement, le programme d'élution consiste en plateaux à proportions stables de méthanol de trois à sept CV suivis d'une transition au plateau supérieur de 1 CV chacune. Le dernier plateau à 100 % de méthanol vise à nettoyer la colonne et faire éluer tout ce qui serait possiblement demeuré pris. La quantité de méthanol débute à 10 % et progresse jusqu'à 100 %. Conséquemment, les produits les plus polaires devraient éluer en premier puisque l'eau est majoritaire et ceux moins polaires seront récoltés vers la fin du programme d'élution. Ce programme a été développé et ajusté sur plusieurs essais afin d'optimiser la séparation des analytes et d'obtenir des fractions distinctes. Un exemple du patron d'élution généré par l'appareil sur 400 mg d'analyte initial est présenté à la figure 3.1 :

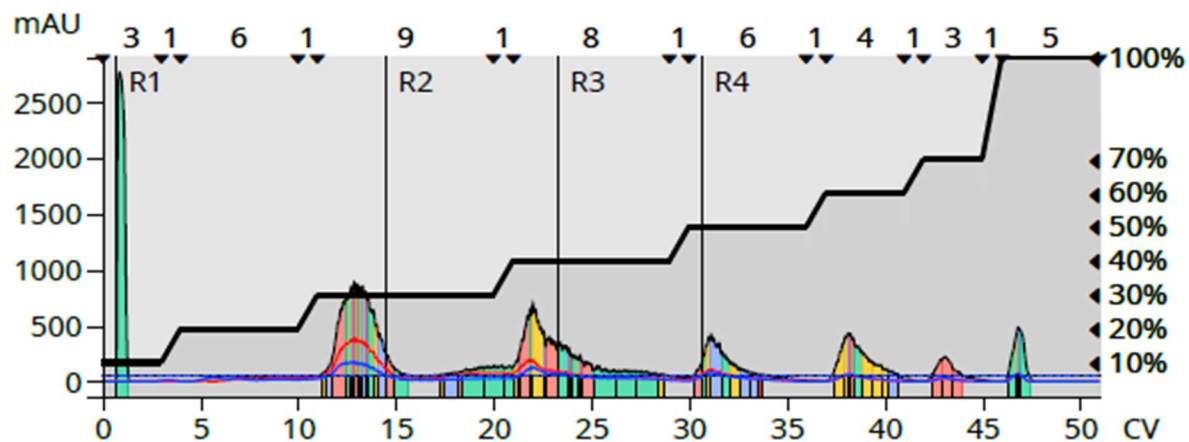
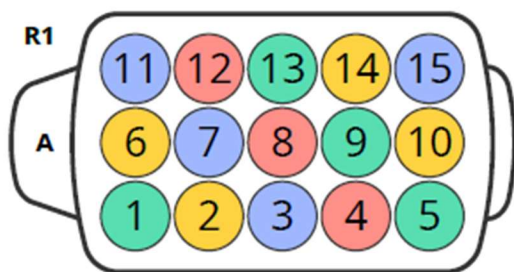


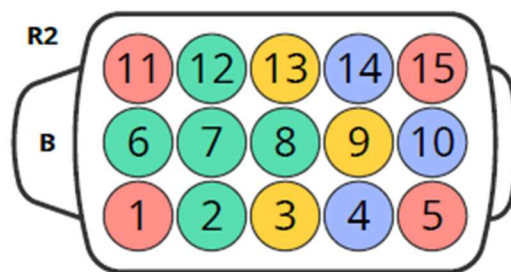
Figure 3.1 Rapport d'élution de la séparation par système automatisé Biotage

On peut observer le programme d'élution sur l'axe du dessus. De même, le total des volumes injectés est présenté sur l'axe du dessous. L'axe de droite représente la proportion de solvant A (méthanol dans le cas présent) qui est injecté. La courbe noire au centre montre graphiquement cette évolution de polarité. On y distingue facilement les plateaux de concentration appliqués. Finalement, l'axe de gauche quantifie le signal obtenu par détection UV-Visible. On distingue sur ce rapport, les fractions distinctes obtenues. Le premier signal appartient au DMSO qui a été utilisé pour solubiliser l'échantillon entièrement. Ces six fractions sont récoltées et stockées dans des éprouvettes. Les indications R suivies d'un numéro représentent les supports à éprouvettes (racks) dans lesquelles les fractions se retrouvent. Chaque changement de couleur signifie un changement notable de l'intensité du signal. Les éprouvettes sont remplies en séquence jusqu'à capacité ou lorsque le signal change significativement. Une fois le programme terminé, il suffit de combiner les éprouvettes appartenant à une fraction et de les évaporer pour obtenir le produit pur désiré. Un exemple de la section des supports à éprouvettes fournie dans le rapport est présenté à la figure 3.2 ci-dessous :

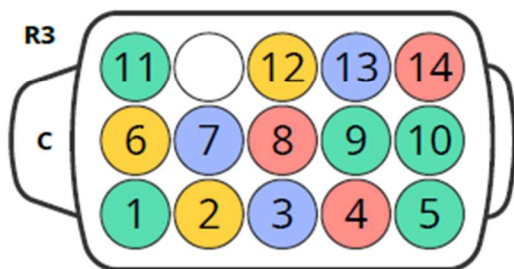
Racks



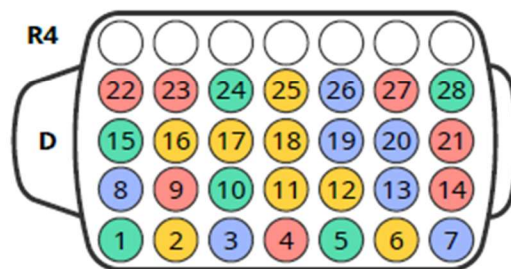
Rack Type: 25 x 150 mm, 45 mL
Rack ID: 0



Rack Type: 25 x 150 mm, 45 mL
Rack ID: 0



Rack Type: 25 x 150 mm, 45 mL
Rack ID: 0



Rack Type: 16 x 150 mm, 22 mL
Rack ID: 16142028411268716051

Figure 3.2 Section des éprouvettes récoltées du rapport de l'appareil Biotage

En combinant le rapport précédemment présenté et cette section, il est aisé de regrouper les éprouvettes appartenant à une fraction. Par exemple, la fraction 5 ne contient que des éprouvettes subséquentes en rouge se trouvant vers la fin du support 4 ou D. Pour obtenir cette fraction pure, il suffit de combiner les éprouvettes 21, 22 et 23 du support D dans un ballon dont on connaît la masse. Une fois évaporé, on obtient le produit désiré ainsi que la quantité récoltée. Puisque qu'excéder 400 mg d'extrait de départ tendait à saturer la colonne et le détecteur, il a été nécessaire de faire plusieurs séparations subséquentes et de combiner les extraits afin d'obtenir une masse appréciable de chaque fraction pour les analyses futures. Les rapports graphiques de chaque séparation peuvent être consultés à l'annexe E. Le tableau 3.2 suivant présente un résumé de ces extractions :

Séparation	Masse	F1	F2	F3	F4	F5	F6
	(mg)	30 MeOH/70 H ₂ O	40 MeOH/60 H ₂ O	50 MeOH/50 H ₂ O	60 MeOH/40 H ₂ O	70 MeOH/30 H ₂ O	100 MeOH/0 H ₂ O
1	200	A : 4-14	A : 16-26	A : 27-30	A : 31-35	B : 3-4-5	B : 6-7
2	213	A : 4-31	A : 32-35 B : 1-9	B : 10-20	B : 21-27	B : 28-29	B : 30-31
3	400	A : 4-15 B : 1-14	B : 15-34	B : 35 C:1-14	C : 15-24	C : 25-32	C : 33-35 D:1-2
4	400	A : 3-15 B:1-9	B : 10-28	B : 29-35 C:1-9	C : 10-21	C : 22-28	C : 29-32
5	400	A : 4-15 B: 1-10	B : 11-29	B : 30-35 C:1-8	C : 9-21	C : 22-28	C : 29-33
6	400	A : 4-15 B:1-9	B:10-28	B:29-35 C : 1-9	C:10-20	C:21-27	C:28-33
7	400	A:3-15	B:6-34	C:2-15	C16:27	C:29-35	D : 1-4
8	400	A:5-15 B : 1-4	B5:15 C : 1-7	C:8-15 D : 1-4	D:8-19	D:20-29	D:31-34
9	400	A:4-35	B:5-15	C:1-11	C:12-15	D:11-19	D:21-24
10	400	A:2-15 B : 1-2	B:3-15 C : 1-13	C14 D:1-10	D:11-20	D:21-23	D:24-28
11	400	A:15-25	B:1-15 C : 1-2	C:3-13	C:15 D : 1-11	D:13-20	D:21-24
Bilan de masse (mg)	4013	1301,8	828,4	589,7	363,1	169,4	133,2
Bilan de masse (%)	84,37	32,44	20,64	14,70	9,05	4,22	3,32

Tableau 3.2 Synthèse des séparations de l'extrait antimicrobien

Comme le démontre le tableau précédent, les fractions ont toutes été récoltées à des polarités de solvant identiques d'une extraction à l'autre. La fraction # 1 devrait donc logiquement contenir des composés plus polaires, que la fraction 2, et ainsi de suite. La fraction # 6 devrait être composée majoritairement de molécules non polaires. Au total un peu plus de 4000 mg ont été injectés dans la colonne sur onze séparations. De cette masse, 84,37 % ont été récupérés dans les différentes fractions. La fraction F1 est majoritaire avec 32,44 % de la masse injectée. Elle est suivie par F2, et F3 qui composent 20,64 % et 14,70 % respectivement de la masse totale injectée. Finalement, F4, F5 et F6 sont minoritaires avec 9,05 %, 4,22 % et 3,32 % de la masse. Les 15,63 % manquants sont probablement restés coincés dans la colonne par affinités avec la phase stationnaire. Il est possible que cette masse ait été envoyée dans les rejets lorsque le signal était sous le seuil de récolte. Aussi, il est à noter que lorsqu'il n'y avait pas une coupure nette entre les fractions, ces éprouvettes ont été rejetées. Ceci peut aussi expliquer la récupération mesurée.

Cette séparation vise à réduire le nombre de molécules dans l'extrait et ultimement, de simplifier l'identification de celles-ci. À cet effet, les fractions obtenues seront analysées par des méthodes comme la chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse. Cependant, avant de procéder, davantage d'informations sont nécessaires puisqu'une recherche générique peut faire l'objet d'un projet de plusieurs années. C'est pourquoi il faut concentrer les efforts sur un nombre plus réduit de candidats possibles. C'est ce qui sera effectué à la section suivante.

3.1.2 Détermination des familles de molécules dans les fractions

Afin d'avoir un peu plus d'informations sur la nature de chaque fraction, une méthode issue de la littérature⁸², utilisant la RMN HSQC a été appliquée. Cette technique consiste à obtenir les spectres HSQC des fractions et d'identifier les signaux caractéristiques de certaines familles de molécules en l'occurrence, les terpènes, les sucres et les tannins en encerclant les régions caractéristiques sur le spectre. Les terpènes sont des molécules de type hydrocarbures linéaires ou cycliques présentes dans les espèces végétales. Ceux-ci sont non polaires et seront normalement élués dans la portion la plus apolaire du programme d'éluion. Leurs signaux devraient donc se situer entre 0 et 3 ppm en proton et entre 0 et 40 ppm en carbone. Ceci est la région des liens simples des hydrocarbures⁸³. Les sucres sont des composés cycliques polaires que l'on retrouve dans les métabolismes de plusieurs espèces ainsi que dans la cellulose. La région caractéristique se situe de 3 à 4,75 ppm en proton et de 40 à 70 ppm en carbone. Ces déplacements chimiques proviennent des nombreux liens « CH-OH » ou « CH-OC » greffés sur le cycle. Étant donné que

les échantillons ont été analysés dans le méthanol deutéré afin de tout solubiliser, il faut prendre précaution de ne pas inclure le signal résiduel du solvant se trouvant à 3,30 ppm en proton et 49 ppm en carbone ou encore celui de l'eau dissoute dans le méthanol à 4,87 ppm en proton. Les tannins sont quant à eux des composés phénoliques hydrosolubles⁸⁴ qui se retrouvent entre autres dans les végétaux, les fruits et conséquemment dans le vin⁸⁵. Ils peuvent se présenter sous une multitude de structures qui elles-mêmes, peuvent contenir une unité de sucre⁸⁵. Ceux-ci comportent entre autres des groupements aromatiques, leurs signaux caractéristiques se trouvant entre 5,5 et 8,0 ppm en proton et de 100 à 140 ppm en carbone. Le but ici n'est pas de connaître la structure exacte des composés. Ce travail dépasse nettement la portée du projet. L'objectif est simplement de donner des pistes de réponse afin de concentrer les efforts d'identification sur une famille de molécule.

C'est pourquoi les résultats seront seulement classés selon l'intensité du signal observé. Plus précisément, chaque région caractéristique sur les spectres sera encadrée et l'intensité du signal sera identifiée comme absente, minoritaire ou majoritaire. Les spectres HSQC des fractions 1 à 6, obtenues par séparation sur colonne de silice tel que décrit au à la section 3.1.1 ont été acquis sur l'appareil RMN Bruker 300 MHz (annexe A, #3) disponible chez Kemitek. Le spectre RMN HSQC de la fraction # 1 est présenté à la figure 3.3 :

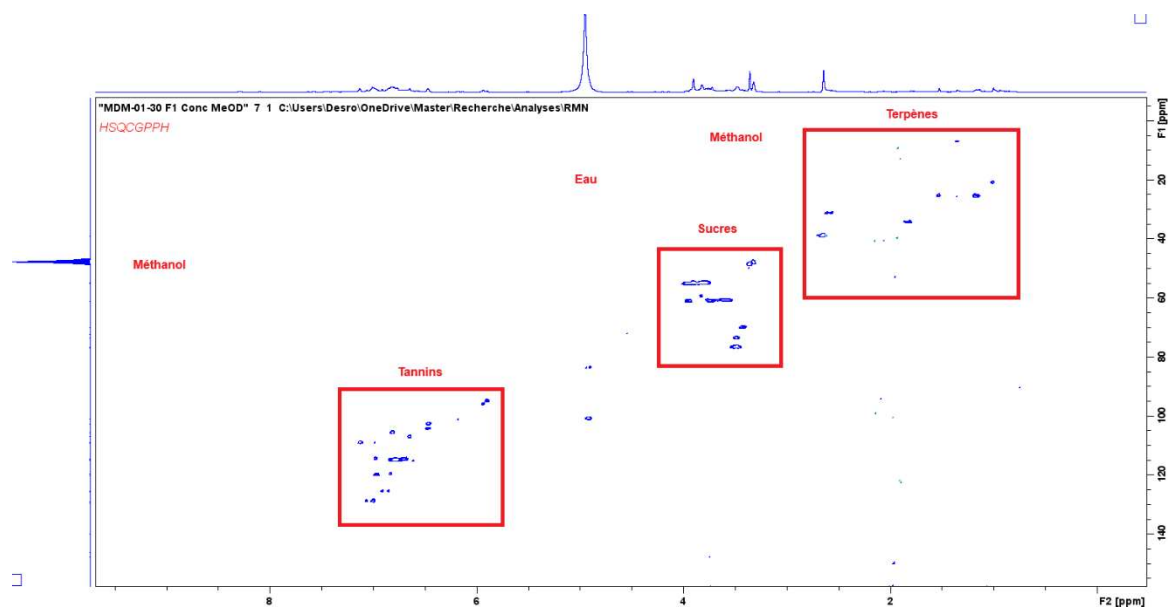


Figure 3.3 Spectre RMN HSQC de la fraction # 1 obtenue après séparation sur silice C-18

De ce spectre RMN HSQC, on peut observer les trois plages caractéristiques attribuées aux familles de molécules étudiées. Si on compare seulement l'intensité relative des encadrés, on observe que les tannins et les sucres sont similaires. Les signaux des terpènes cependant sont moins intenses que les deux autres. Conséquemment, les familles des tannins, des sucres et des terpènes sont notées comme étant majoritaire, majoritaire et minoritaire respectivement. Le même processus est appliqué aux fractions 2 à 6 obtenues suite aux séparations résumées au tableau 3.2 et les spectres peuvent être consultés à l'annexe C, section 3.1.2. Afin de mieux visualiser les résultats, le tableau 3.3 a été construit. Il est présenté ci-dessous :

Fraction	Tannins	Sucres	Terpènes
F1	Majoritaire	Majoritaire	Minoritaire
F2	Minoritaire	Majoritaire	Absent
F3	Minoritaire	Majoritaire	Minoritaire
F4	Absent	Majoritaire	Minoritaire
F5	Absent	Minoritaire	Minoritaire
F6	Absent	Absent	Majoritaire

Tableau 3.3 Familles de molécules identifiées par RMN HSQC suite à la séparation sur silice C-18

De ces données, on observe que les tannins sont concentrés dans la fraction 1 éluée avec l'eau majoritaire à 70 %, tandis que les terpènes sont obtenus surtout dans la fraction 6 éluée avec 100 % de méthanol. Les sucres quant à eux sont présents surtout dans les fractions 1 à 4, et absents totalement de la fraction 6. Ces informations seront pertinentes lorsque viendra le temps d'identifier avec précision les molécules antimicrobiennes. Cette identification est nécessaire pour la commercialisation du traitement antimicrobien de la pomme de terre.⁸⁶

Avant de débiter l'identification formelle des molécules, il est impératif de déterminer laquelle ou lesquelles des fractions obtenues sont actives sur le plan antimicrobien. Pour se faire, des analyses de microbiologie en laboratoire sont nécessaires.

3.1.3 Formulation

En prévision des analyses antimicrobiennes, il faut formuler l'extrait antimicrobien comme s'il était appliqué sur les pommes de terre. Ces travaux précédant le début du mémoire ont été réalisés par l'équipe dans le cadre du projet précédent et n'ont pas été publiés). La formulation développée pour l'extrait original extrait à l'eau est relativement simple. Environ 0,5 g de l'extrait est pesé dans un flacon pouvant contenir au moins 12 mL. Il est dissous dans un gramme d'éthanol pur, mais exempt d'eau, directement dans le flacon. Ensuite, trois grammes de propylène glycol sont ajoutés et incorporés à la solution d'éthanol. Finalement, six grammes d'eau déminéralisée ou distillée sont introduits et le tout est agité jusqu'à homogénéité. Puisque ce protocole avait été développé pour des extraits aqueux, un solide en suspension persistait et une filtration s'avérait nécessaire. Un filtre à seringue avec membrane en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de porosité nominale de 0,45 μm a été choisi pour sa facilité d'utilisation. Cette filtration a été appliquée à tous les échantillons analysés.

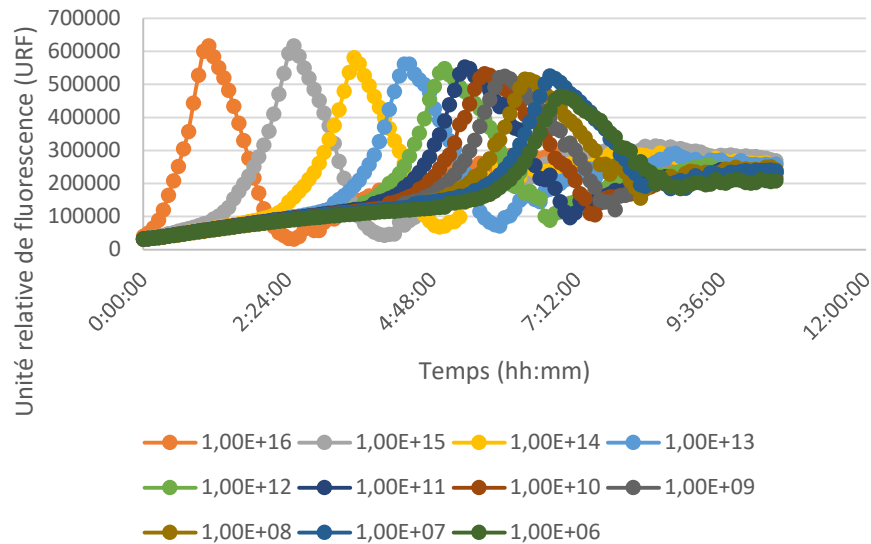
3.1.4 Analyses antimicrobiennes des fractions séparées

Les analyses d'activité antimicrobienne ont été réalisées sur un lecteur de microplaques (voir annexe A, entrée 8) par le partenaire Innofibre. Toutes les fractions ont été analysées ensemble. La méthode d'analyse est basée sur la cinétique de réduction de la résazurine en résorufine et subséquentement en hydrosorufine. Voici un extrait décrivant la méthode utilisée par Innofibre, qui elle-même, est adaptée de la méthode P031-020 « Procédure de test d'efficacité germinice de désinfectants liquides » du partenaire Sani-Marc. La procédure en entier peut être consultée à l'annexe F.

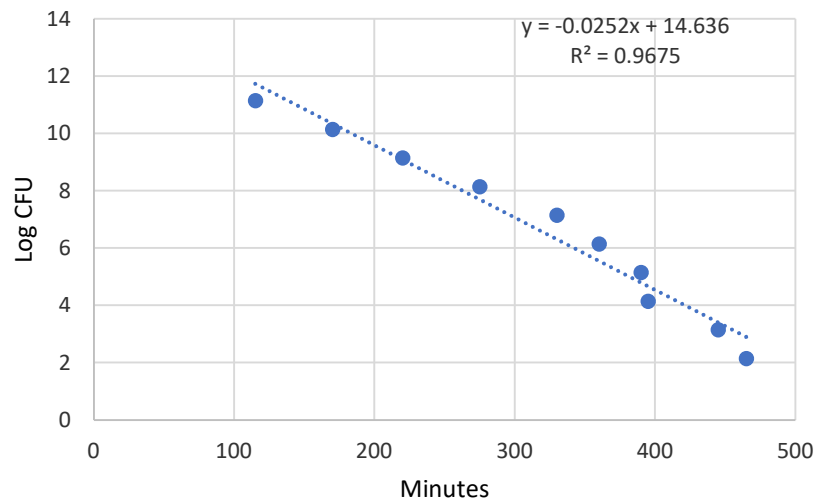
« La résazurine est un composé non fluorescent qui est réduit en résorufine, fluorescent dans le rouge, par le métabolisme cellulaire des bactéries. Une fois la résazurine complètement réduite en résorufine, l'intensité de fluorescence est à son maximum. La résorufine est ensuite réduite, encore par le métabolisme cellulaire, en hydrosorufine, non fluorescent. Le temps nécessaire pour atteindre la valeur maximale de fluorescence ayant une relation linéaire au nombre de bactéries dans une concentration très large (1×10^2 à 1×10^{12} UFC/mL), il devient possible, avec une courbe standard, de mesurer les logs de réduction de bactéries dans un échantillon. Le graphique ci-dessous présente la cinétique de fluorescence de la

rézasurine pour des bouillons de culture d'E. coli, de concentrations allant de $1,00 \times 10^{16}$ à $1,00 \times 10^6$ CFU/mL.

En utilisant la donnée du temps (minute) auquel est mesurée l'intensité maximale de fluorescence (le « pic »)



pour chacune des courbes du graphique, il est possible de calculer une droite de régression et ainsi obtenir une courbe standard pour estimer le nombre de CFU, comme présenté dans le graphique ci-dessous. »



Suivant des manipulations dans un programme de calcul tel que Microsoft Excel, il est possible d'estimer le nombre de colonies de bactéries et subséquemment, la différence entre un échantillon témoin et ceux sur lesquels un traitement antimicrobien a été appliqué. Les résultats sont exprimés en logarithmes (log) de réduction par rapport à un échantillon de population identique non traité.

En plus des échantillons testés, deux contrôles ont été ajoutés. Premièrement, un blanc constitué de la formulation vierge (10 % EtOH, 30 % propylène glycol et 60 % eau) est analysé pour vérifier si celle-ci possède un pouvoir antimicrobien. Deuxièmement, l'éthanol 30 % est analysé dans les mêmes conditions que les échantillons. L'éthanol étant un produit commun, il ne changera pas d'une analyse à l'autre et devrait donc être constant dans son pouvoir désinfectant et agit à titre de contrôle. La variation proviendra plutôt du microorganisme vivant utilisé qui lui peut varier d'une culture et d'une souche à une autre. Le contrôle sert habituellement à comparer des résultats provenant de deux plaques distinctes. En effet, les plaques étant d'une capacité limitée, il est impossible de tester tous les échantillons ensemble sur le court d'un projet. De plus, il est intéressant de pouvoir comparer deux plaques analysées à différents moments tout au long d'un projet de plusieurs mois voire années. C'est ici qu'entre en jeu la normalisation des résultats. Afin de pouvoir comparer les données d'une plaque à l'autre, les valeurs de log de réduction obtenues sont habituellement ajustées selon le log de réduction que présente l'éthanol. Pour les études présentes, une erreur s'est malheureusement glissée. En effet, sur les trois plaques réalisées durant cette étude, deux auront comme contrôle l'éthanol 30 % tandis que pour la dernière, l'éthanol 70 % a été utilisé. Ceci rend la normalisation par l'éthanol impossible. Le blanc de formulation sera exceptionnellement utilisé à la place du contrôle pour effectuer les calculs de normalisation. Premièrement, la moyenne des blancs des trois plaques à l'étude dans ce travail sera calculée. Les valeurs des logs de réduction des plaques seront ajustées selon la différence par rapport à la moyenne des blancs et du blanc de cette plaque. Par exemple, si la plaque A présente un blanc 25 % plus bas que la moyenne des blancs, toutes les valeurs de cette plaque seront majorées de 25 %. Ceci a pour effet de normaliser les valeurs afin qu'elles soient comparables d'une plaque à l'autre.

Le graphique 3.4 suivant présente les résultats des analyses antimicrobiennes des fractions obtenues par séparation sur colonne de silice automatisée accompagnées de l'extrait entier et de ses contrôles :

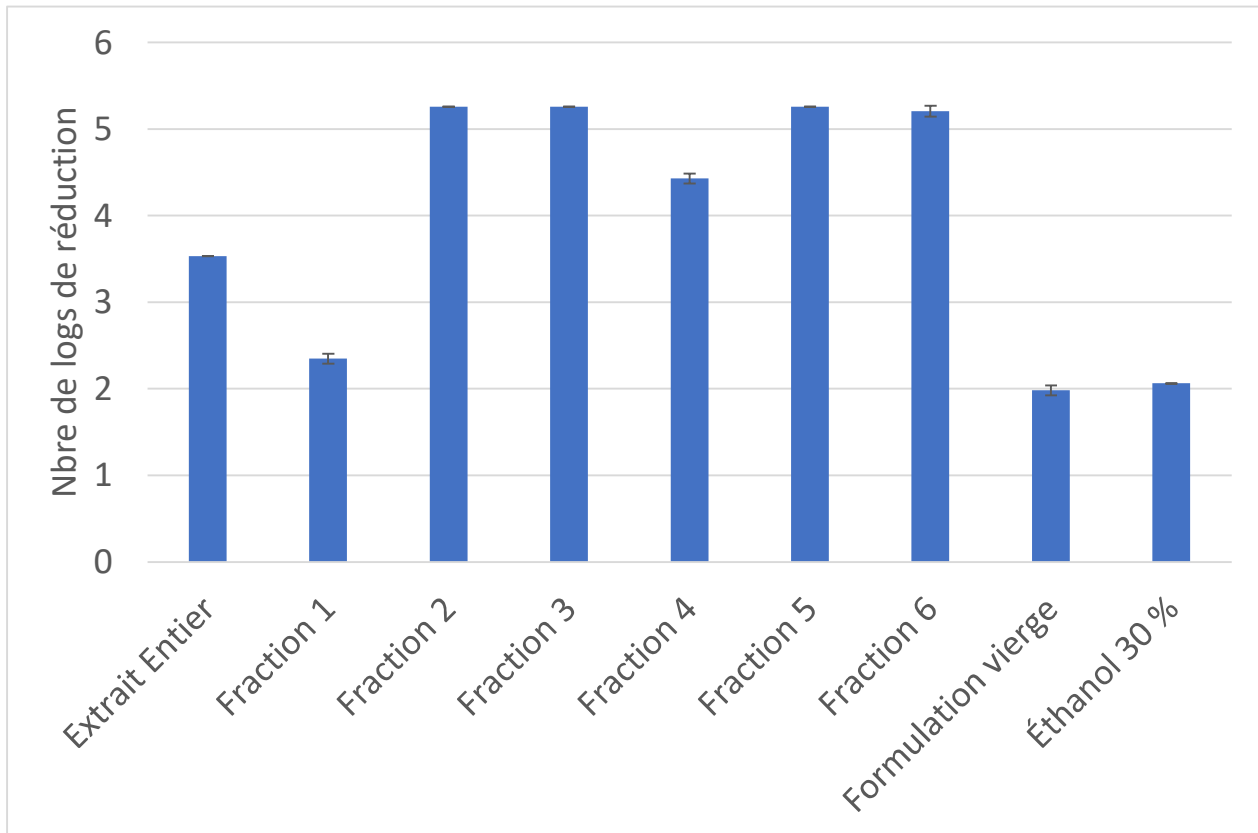


Figure 3.4 Réduction de l'activité microbienne par les fractions isolées

Afin d'interpréter les résultats, il importe de se rappeler que ceux-ci sont présentés en logarithmes de réduction de l'activité microbienne. Une valeur élevée signifie un grand pouvoir antimicrobien. Compte tenu des concentrations de bactéries appliquées dans les puits, une valeur de 6 correspond à une élimination complète des colonies de bactéries dans ce puits. Ceci est habituellement appelé « *Total kill* » et ne peut être excédé. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type pour l'échantillon étudié. Puisque chaque échantillon est analysé en triplicata, il est possible d'obtenir ces données statistiques. À noter que les écarts types varient de 0 à 0,06 log dans cette plaque.

À la vue de la figure 3.4, on peut observer que les fractions seules présentent de meilleurs pouvoirs antimicrobiens que l'extrait entier. Ceci peut être expliqué par la fraction 1 qui, bien qu'elle soit majoritaire avec 32,44 % de la masse de l'extrait, est faiblement active envers les organismes étudiés. Les fractions 2, 3, 5 et 6 semblent les plus prometteuses en termes d'activité antimicrobienne. Cependant, les fractions 5 et 6 ne représentent que 7,54 % de la masse récupérée comme le mentionne le tableau 3.2. Elles ne sont pas avantageuses d'un point de vue du rendement. La fraction 4 représente 9,05 % de la masse récupérée, mais son activité n'est pas au même niveau que les plus actives. Les fractions 2, 3 et 4 quant à elles, représentent 44,39 % de la masse totale. Ce sont ces trois fractions qui seront privilégiées par le comité de projet à ce stade dans le développement du traitement puisqu'elles sont non seulement très efficaces pour éliminer les microorganismes étudiés, mais elles sont aussi abondantes. Des échantillons seront envoyés chez les partenaires pour étudier la composition chimique des fractions. Les informations obtenues à la section 3.1.2 *Détermination des familles de molécules*, soit le fait que les composés de type sucres y sont majoritaires, les tannins y sont minoritaires et que les terpènes y sont absents leur seront d'une grande utilité.

À ce stade dans le projet, la séparation bioguidée s'avérait suffisante pour les besoins du projet et nous étions en attente des études plus poussées des partenaires. Puisqu'une grande portion de l'échantillon (Fraction 1, 35 % de la masse) n'était que peu active comme vu à la figure 3.4, il a été envisagé d'optimiser l'extraction initiale pour tenter d'extraire sélectivement les molécules actives. C'est le fruit de cette initiative qui sera présenté pour le reste de ce chapitre.

3.2 Optimisation de l'extraction

L'extraction de l'agent antimicrobien à partir de l'écorce d'épinette noire a été réalisée initialement par Innofibre à l'aide d'un procédé utilisant de l'eau sous pression ⁸⁷. Cette méthode, quoique sécuritaire, présente des désavantages notoires particulièrement au niveau de la complexité du procédé et de sa demande en temps de travail. Celle-ci consiste à macérer les écorces broyées et séchées préalablement dans l'eau à une teneur d'environ 8 litres par kilo d'écorce. Cette cuisson à 100 °C dans un réacteur sous pression (20 psi) d'une durée de 20 minutes produit, après filtration et essorage, un « jus de cuisson » chargé des molécules d'intérêt. Celui-ci est alors concentré à une siccité ou teneur en solides d'environ 2 % par évaporation de l'eau. Un solvant organique, l'acétate d'éthyle, est mélangé au jus de cuisson concentré pendant une heure et est ensuite décanté. Lors de la décantation, trois phases sont présentes soit une phase organique au-dessus, une phase d'émulsion au centre et une phase aqueuse en dessous. La phase d'émulsion peut représenter jusqu'à 30 % du volume total et s'avère très difficile à briser. Elle est donc considérée comme une perte. La phase aqueuse récoltée est séparée de l'émulsion et a pour but d'être revalorisée comme biostimulant dans le cadre d'un projet subséquent financé par le gouvernement fédéral canadien. La phase organique, quant à elle, est prélevée et évaporée à sec à l'évaporateur rotatif. Le solide collant en résultant est finalement resolubilisé dans un minimum de méthanol, récupéré dans un contenant à grande surface telle une plaque afin d'optimiser la surface d'évaporation du solvant et évaporé au four sous vide. Le four est réglé à 40 °C et la pression est diminuée graduellement jusqu'à environ 100 torrs. Finalement, le solide est gratté de la plaque avec une spatule et récupéré. Le produit résultant est un solide amorphe brun marron dont émane une odeur de bois résineux. Ce processus comporte une multitude de désavantages : i) l'utilisation de trois solvants (eau, acétate d'éthyle, méthanol) dont seul l'acétate d'éthyle est récupéré, ii) l'évaporation de ceux-ci ainsi que iii) une extraction liquide-liquide formant une émulsion importante. C'est pourquoi il a été envisagé d'optimiser l'extraction en utilisant un solvant organique dès le départ. Ceci permettra de réduire les intrants et les étapes afin d'alléger le procédé en termes de temps, de main-d'œuvre et ultimement en termes d'argent.

3.2.1 Extractions au solvant

Un plan d'expérience a donc été élaboré afin d'étudier l'effet de différentes conditions sur le rendement et les activités antimicrobiennes des solides obtenus. Le tableau récapitulatif 3.4 des essais est présenté ci-dessous :

Essai	Solvant ¹	Température	Pression ²	Durée	Émulsion	Masse finale	Rendement
		(°C)	(psi)	(mins)	(% v/v)	(g)	(%)
1	Eau	100	<20	20	30	1,75	1,17
2	EtOAc	25	0	20	0	6,60	4,39
3	EtOAc	70	0	20	0	8,10	5,40
4	EtOAc	80	<20	20	0	8,22	5,47
5	EtOAc	100	20	20	0	8,77	5,84
6	EtOAc/H ₂ O 80/20	100	20	20	5	8,68/0,45	5,79
7	EtOAc/H ₂ O 50/50	100	20	20	1.5	~7,50	5,00
8	EtOAc/H ₂ O 20/80	100	20	20	0	3,89	2,59

1. Dans tous les cas, 150 g d'écorces et 1200 mL de solvant furent utilisés.

2. La pression rapportée est la pression lue sur la jauge de pression connectée au réacteur. Celle-ci indiquera 0 psi à pression ambiante.

Tableau 3.4 Optimisation des conditions d'extraction de l'agent antimicrobien

Un échantillon d'écorce de 2 kg produit en juin 2021 a été généreusement fourni par Innofibre. Parmi les équipements disponibles, le réacteur conçu pour la haute pression et haute température était le plus adapté aux besoins puisqu'il permet de chauffer des solvants au-delà de leur point d'ébullition. Ce réacteur de Parr Instruments (voir annexe A, #9) est équipé pour soutenir une pression pouvant monter jusqu'à 1900 psi. Il peut être chauffé activement par des éléments chauffants jusqu'à une température de 300 °C. Le contenu du réacteur est agité mécaniquement et peut être refroidi à l'aide d'un courant d'eau froide circulant dans un serpentín plongé dans le mélange. Équipé d'une soupape de sûreté pouvant soutenir jusqu'à 1900 psi ou 130 atm, il est sécuritaire d'y réaliser des manipulations pouvant développer une pression.

Pour chaque essai prévu, 150 g d'écorces séchées ont été mélangés avec le solvant à raison de 1200 mL à l'intérieur du réacteur. Le chauffage a été démarré avec la température désirée en point de consigne. De même, l'agitation a été mise en marche afin de bien homogénéiser la suspension. Le temps de chauffage, sauf pour l'essai # 2, était d'environ 30 à 40 minutes et lorsque la température a été atteinte, elle a été maintenue pour une durée de 20 minutes. Ces étapes sont communes à tous les essais réalisés. Comme le démontre le tableau 3.4, la nature du solvant et la température sont les deux facteurs qui ont été étudiés.

Premièrement, un extrait utilisant le même procédé à l'eau que celui décrit ci-haut ⁸⁷ a été produit (Tableau 3.4, entrée 1). Celui-ci servira de témoin lors des analyses ultérieures afin de comparer l'efficacité antimicrobienne avec les nouveaux extraits isolés. À la suite de la cuisson au réacteur Parr, le produit a été tamisé sur un tamis de porosité de 1,18 mm puis essoré sur un banc de filtration (voir annexe A, #10). Ce banc de filtration est constitué d'un piston de téflon dans une enceinte métallique. Ce piston est poussé par une pression générée par de l'air comprimé et essore les écorces imbibées d'eau. Puisque la grille utilisée pour l'essorage est assez grossière avec des pores de l'ordre du millimètre, le filtrat contient des particules fines d'écorces et a été filtré finement sur Büchner avec un filtre Fisher P8 de porosité 20-25 µm. La phase aqueuse a été concentrée à l'évaporateur rotatif chauffé à 60 °C afin d'obtenir une siccité d'environ 2 %. Puisqu'il est difficile d'évaluer la teneur en solide durant l'évaporation, la phase aqueuse a été évaporée jusqu'à ce que le volume semble, à l'œil, adéquat. Le volume mesuré était alors de 300 ml. Après analyse à l'aide d'une balance thermogravimétrique, la quantité de matière solide mesurée était de 2,59 %. Le concentré a donc été redilué à un volume de 400 mL total pour obtenir une matière sèche calculée de 2 %. Cette phase ajustée a ensuite été ajoutée dans une ampoule à décanter et une portion d'acétate d'éthyle de 400 mL a été ajoutée. Après agitation légère, une émulsion d'environ 30 % du volume total a été observée. Cette émulsion a été séparée des phases aqueuses et organiques puis mesurée dans un cylindre gradué. Les phases organiques et aqueuses ont été séparées en laissant derrière l'émulsion. La phase organique a été évaporée à l'évaporateur rotatif sous atmosphère réduite à une température de 50 °C. Finalement, le solide obtenu a été dissout dans un mélange 50/50 méthanol/eau puis évaporé au four à 60 °C durant la nuit. L'objectif était d'échanger le solvant initial ayant un point d'ébullition plus élevé par l'ajout d'un solvant à moindre point d'ébullition. Par la même occasion, la formation d'un azéotrope ⁸⁸ avec l'acétate d'éthyle a été favorisée en ajoutant de l'eau. Ce procédé a produit 1,75 g de solide final pour un rendement de 1,17 % par rapport à la masse d'écorce initiale. Ce solide était similaire en apparence à ceux obtenus par Innofibre précédemment.

Pour le deuxième essai (Tableau 3.4, entrée 2), le solvant organique d'extraction, soit l'acétate d'éthyle a été utilisé dès le départ à des températures variables. Celui-ci a été fait à température de la pièce ou 25 °C dans le cas présent. Le chauffage étant un procédé très énergivore en industrie, il serait avantageux de pouvoir l'éliminer à cette étape. À la suite d'une macération d'une durée de 20 minutes à 25 °C, la suspension a été filtrée sur un filtre de type Fisherbrand modèle P8 de porosité nominale 20-25 µm et les écorces ont été rincées avec 300 mL d'acétate d'éthyle. Le filtrat a ensuite été concentré à l'évaporateur rotatif sous un chauffage à 60 °C. Lorsque le volume était réduit à environ 100 mL, le liquide a été transféré dans un ballon taré et évaporé à sec sous les mêmes conditions. Finalement, 6,60 g d'un solide collant ont été récoltés pour un rendement massique de 4,39 % par rapport à la masse d'écorces. Ce rendement est inférieur aux essais 3,4 et 5 aussi réalisés dans l'acétate d'éthyle. Ceci peut être justifié par le temps total de contact. En effet, pour tous les essais sauf celui-ci, un temps de chauffage est nécessaire et ce temps constitue une macération additionnelle des écorces dans le solvant résultant en un rendement potentiellement plus élevé. Finalement, une resolubilisation au méthanol telle que décrite dans le procédé original a été effectuée sur une portion de 2,05 g afin de complètement évaporer le solvant résiduel. Cependant, la masse recueillie après évaporation du méthanol de 2,035 g suggère qu'il n'y avait que peu ou pas d'acétate d'éthyle résiduel dans le solide. L'analyse RMN ¹H du produit à la figure 3.5 ci-dessous confirme cette hypothèse :

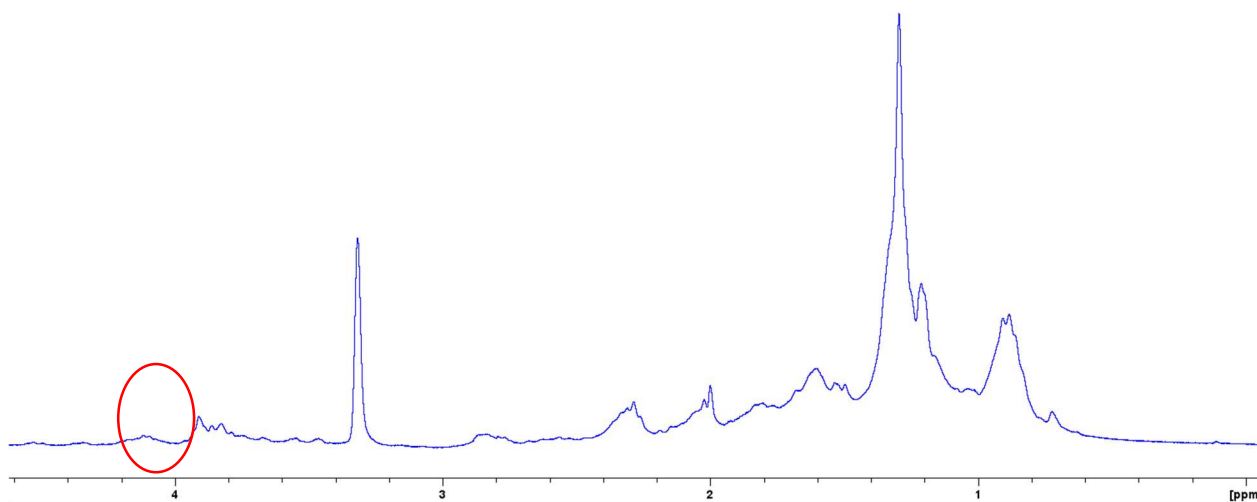


Figure 3.5 Analyse RMN ^1H de l'extrait #2 après échange de solvant

L'acétate d'éthyle, possédant des signaux à 1,24, 2,01 et 4,09 ppm dans le méthanol deutéré serait facilement visible s'il était présent, spécialement à 4,09 ppm (encerclé) où il n'y a que très peu de signal et aucun signal caractéristique du solvant recherché. Cette étape d'échange de solvant a donc été délaissée pour les essais subséquents.

Le troisième essai a été mené à 70 °C sous le point d'ébullition de l'acétate d'éthyle qui est de 77 °C (Tableau 3.4, entrée 3). Ces conditions ont été choisies afin de s'assurer de travailler à la pression atmosphérique dans le cas où un réacteur certifié pour opérer sous pression ne serait pas disponible. Toute température au-dessus du point d'ébullition développera nécessairement une pression de vapeur dans le réacteur. Le procédé est le même qu'à l'essai # 2. À la suite de la filtration et de la concentration à l'évaporateur rotatif, un solide collant est isolé. Celui-ci est similaire à celui obtenu à 25 °C, mais est plus abondant avec une masse de 8,10 g pour un rendement de 5,40 %.

La température a ensuite été modifiée en l'augmentant à 80 °C, soit tout juste au-dessus du point d'ébullition de l'acétate d'éthyle (Tableau 3.4, entrée 4). L'aiguille n'ayant pas atteint la première mesure

du manomètre, on ne peut affirmer avec précision la pression développée. C'est pourquoi il n'est possible d'affirmer qu'une pression d'au maximum 20 psi a été mesurée. Ce quatrième essai a produit un solide similaire aux précédents à raison de 8,219 g pour un rendement massique de 5,47 %.

À l'entrée 5 du même tableau, la température a été augmentée à 100 °C afin de pouvoir comparer directement avec l'extraction à l'eau. À cette température, une pression de 20 psi a été mesurée. Après évaporation de l'acétate d'éthyle, 8,77 g de solide a été récolté pour un rendement de 5,84 %.

Évidemment, puisque seul l'acétate d'éthyle a été utilisé pour extraire les écorces séchées, aucune émulsion n'a été obtenue durant le procédé d'extraction des essais 2, 3, 4 et 5. La filtration a été rapide sans que les filtres soient bouchés par des très petites particules ou une phase de type gel. De plus, la solubilisation finale dans le méthanol, comme dans le cas de l'extraction à l'eau, n'a pas été nécessaire. Toutes ces différences sont des avantages notables du point de vue du procédé d'extraction. Les économies de solvant, de temps, d'énergie et d'efforts sont non négligeables et amènent potentiellement le procédé vers une meilleure rentabilité lors de la mise à l'échelle au niveau industriel.

Les essais 6,7 et 8 du tableau 3.4 ont été pensés légèrement différemment. Puisque le procédé initial utilisait de l'eau et que la phase aqueuse récupérée avait pour but d'être revalorisée en tant que biostimulant, il était d'intérêt de conserver l'eau dans le processus. C'est pourquoi ces essais ont été réalisés avec un mélange d'eau et d'acétate d'éthyle. Au lieu de faire une cuisson à l'eau et ensuite d'extraire à l'aide du solvant organique, ce transfert d'analytes de la phase aqueuse à organique se ferait en continu au courant du processus d'extraction. L'hypothèse était que ce transfert in situ ne créerait pas ou peu d'émulsion et donc que la problématique majoritaire du processus initial serait éliminée tout en conservant une phase aqueuse réutilisable comme biostimulant.

Le sixième essai débute avec une majorité de solvant organique à 80 % du volume total. La température d'extraction a été réglée à 100 °C et la pression générée a été mesurée à 20 psi. Lors de l'extraction liquide-liquide, une émulsion comprenant environ 5 % du volume total a été mesurée. Celle-ci a été mise de côté durant l'extraction. La phase organique a été lavée avec trois portions d'eau distillée puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Le solide obtenu avait une masse de 8,682 g pour un rendement massique de 5,79 %.

Le septième essai répète les étapes du précédent, mais en augmentant la proportion d'eau à parité avec le solvant organique. Lors de l'extraction dans l'ampoule, une fine émulsion a été mesurée à environ 1,5 % du volume total. La phase organique a toujours été lavée avec trois portions d'eau puis évaporée. Il en résulte 7,50 g de solide pour un rendement de 5,00 % par rapport aux écorces.

Le huitième et dernier essai quant à lui inverse les proportions de l'essai 6 soit 80 % du volume total en eau et 20 % en acétate d'éthyle. L'hypothèse était que les analytes extraits par l'eau pourraient se solubiliser dans la phase aqueuse immédiatement. La température ciblée est demeurée à 100 °C et la pression mesurée a atteint 20 psi pour une durée de 20 minutes. Lors de la décantation des phases, aucune émulsion n'a été observée. La phase organique a été lavée à l'eau trois fois pour ensuite être séchée et évaporée. De cette phase organique, 2,657 g ont été récoltés. La phase aqueuse originale, quant à elle, a été extraite à l'acétate d'éthyle trois fois puis les portions de solvant ont été combinées, séchées au sulfate de sodium et évaporées. De cet exercice, 1,230 g sont obtenus. Les deux solides ont été combinés pour un total de 3,887 g et un rendement de 2,59 % massique par rapport aux écorces de départ.

3.2.2 Détermination des familles de molécules extraites

En utilisant la même méthode par RMN HSQC ⁸² qu'utilisée à la section 3.1.2, les deux échantillons principaux ont été analysés. Plus précisément, l'extrait #1, produit par macération des écorces dans l'eau à 100 °C suivi d'une extraction liquide-liquide ainsi que l'extrait # 5, obtenu par macération dans l'acétate d'éthyle à 100 °C ont été solubilisés dans le méthanol deutéré puis analysés par la méthode HSQC. Les spectres RMN de l'extrait # 1 et de l'extrait # 5 sont présentés aux figures 3.6 et 3.7 ci-dessous :

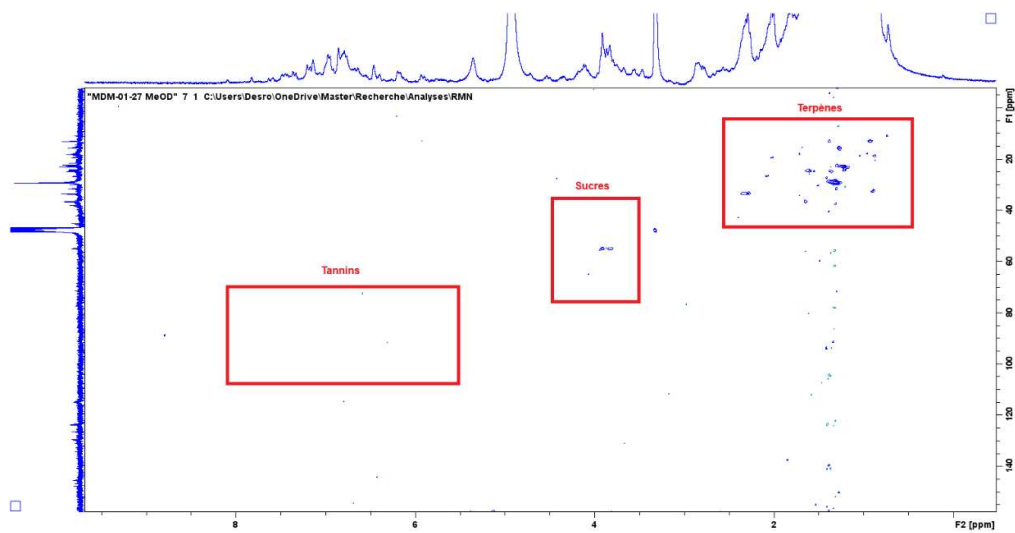
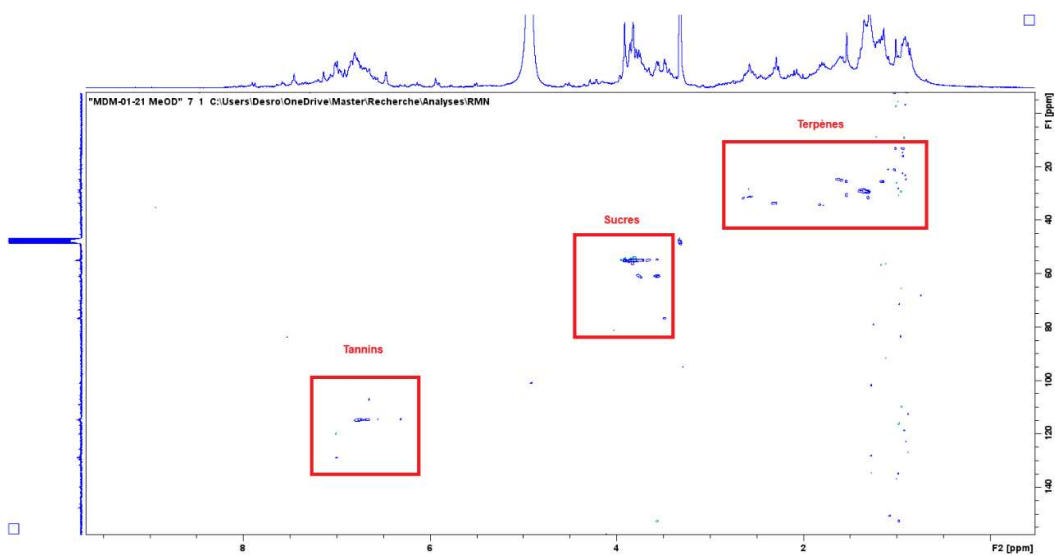


Figure 3.7 Spectre RMN HSQC de l'extrait # 5

Les familles de composés en présence ont été déterminées et les résultats sont compilés au tableau 3.5 suivant :

Échantillon	Tannins	Sucres	Terpènes
Extrait # 1 : Eau 100 °C	Minoritaire	Majoritaire	Majoritaire
Extrait # 5 : EtOAc 100 °C	Absent	Minoritaire	Majoritaire

Tableau 3.5 Famille des composés en présence dans les extraits 1 et 5 – Détermination par RMN HSQC

Seuls les extraits obtenus par les essais 1 et 5 ont été analysés par cette technique, les essais 2, 3, 4, 6, 7 et 8 n'ayant pas été retenus pour la suite du projet dû à leur rendement faible ou à leur complexité d'exécution plus élevée. Les analyses HSQC démontrent que l'utilisation de l'acétate d'éthyle tend à produire un extrait composé majoritairement de molécules provenant de la famille des terpènes. De plus faibles signaux potentiellement associables aux sucres sont aussi détectés. Les signaux habituellement associés aux tannins sont complètement absents du spectre HSQC. En comparaison, le procédé à l'eau résulte en un extrait plus varié en termes de molécules. Les tannins y sont présents, quoique minoritaires. Les sucres et les terpènes sont très présents et composent la majorité de l'extrait. Bien que ces analyses ne puissent pas identifier avec certitude les molécules, elles aiguilleront les travaux futurs afin de recenser les nombreuses composantes des extraits obtenus.

De ces essais, il est possible de déduire que ceux obtenus à l'acétate d'éthyle seul sont les plus prometteurs. En effet, un rendement supérieur, une extraction beaucoup plus aisée et l'absence d'émulsion sont tous des points à considérer lors de la mise à l'échelle du procédé. Cependant, avant de modifier le processus d'extraction utilisé par les partenaires jusqu'à maintenant, il est essentiel de vérifier si les extraits présentent une activité antimicrobienne et si tel est le cas, si celle-ci est inférieure, égale ou supérieure à l'extrait à l'eau précédemment étudié.

3.2.3 Analyses antimicrobiennes par fluorescence

Les analyses ont été réalisées suivant la même méthode que précédemment présentée à la section 3.1.4 sur un lecteur de microplaques (voir annexe A, entrée 8) par le partenaire Innofibre. Tous les échantillons listés au tableau 3.5 ont été analysés ensemble sauf pour l'essai 7 qui lui a dû être déplacé sur la plaque suivante, mais les résultats sont présentés en groupe logique. La normalisation basée sur le blanc (formulation vierge) a été appliquée aux deux plaques qui seront présentées. Il est important de se rappeler que le but de ces analyses n'est pas de déterminer la capacité absolue (Log de réduction) d'un extrait à inhiber la croissance de cellules d'une souche bactérienne, mais bien de comparer les extraits l'un avec l'autre. Des variations seront inévitablement observées lors de l'analyse d'un même échantillon à deux moments différents, et ce pour plusieurs raisons dont la culture de la souche bactérienne et le vieillissement d'un même extrait analysé à deux moments dans le temps pour ne nommer que celles-ci. Les analyses des extraits issus des extractions listées au tableau 3.5 sont présentées dans le graphique 3.8 ci-dessous :

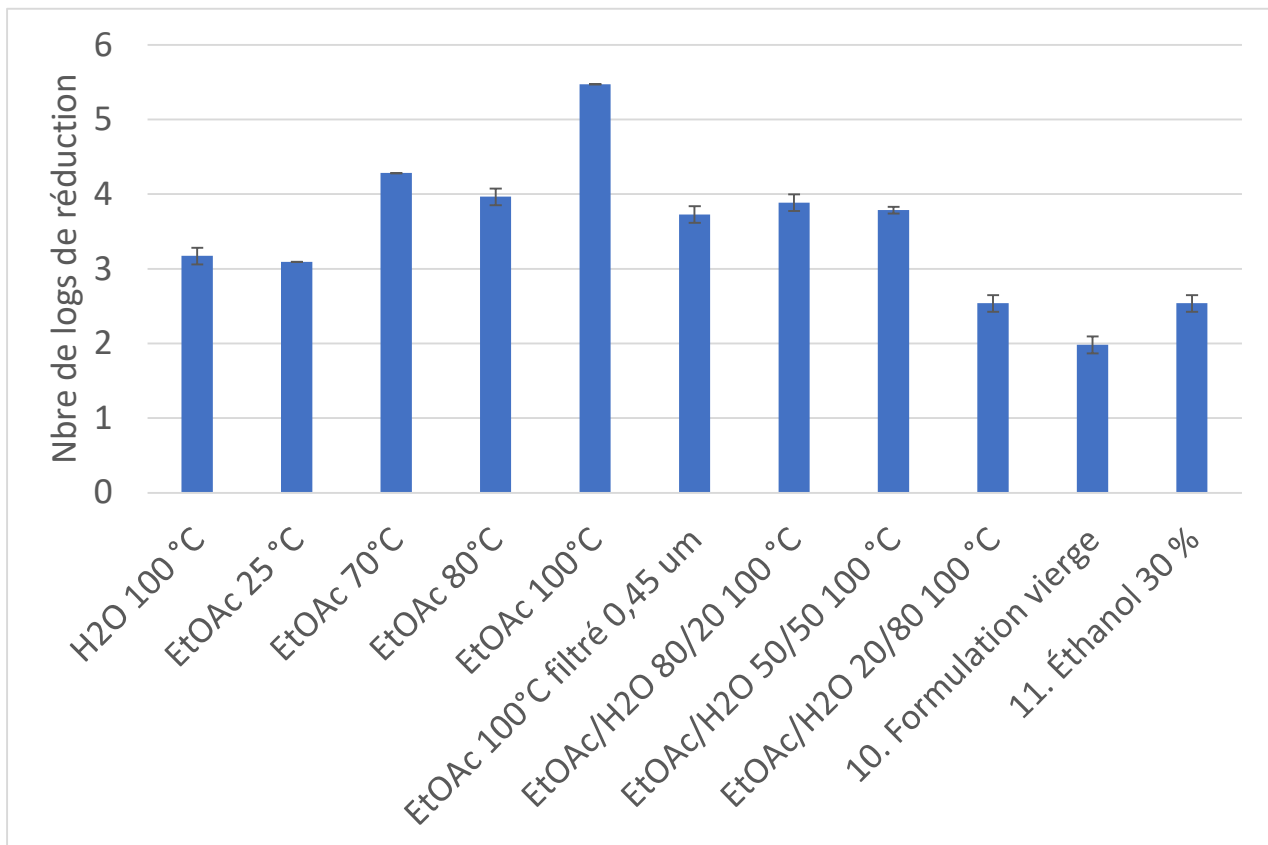


Figure 3.8 Réduction de l'activité microbienne après traitement avec les extraits

Les résultats obtenus sont assez parlants. Les extractions à l'acétate d'éthyle produisent un extrait présentant une activité antimicrobienne similaire (25 °C) ou supérieure (70 °C, 80 °C et 100 °C) à l'extrait à l'eau original. Étrangement, l'extrait produit à 80 °C démontre une activité moindre que ceux réalisés aux températures avoisinantes de 70 °C et 100 °C. Il aurait été attendu que celui-ci soit supérieur au premier, mais inférieur au dernier. Cette variation est probablement due à une erreur expérimentale lors de l'analyse sur plaque. De plus, l'échantillon extrait au solvant à une température de 100 °C a été analysé avec et sans filtration. Ceci a été fait puisque lors de la dissolution des extraits dans la formulation vierge (éthanol, propylène glycol et eau), un précipité s'est formé, ce qui n'était pas le cas avec les extraits à l'eau. Une différence notable est visible et ramène son activité au niveau des extraits à 70 °C et 80 °C. L'effet de la filtration sur l'activité antimicrobienne devra être étudié dans une vague subséquente d'analyses. Finalement, les échantillons utilisant les deux co-solvants (Acétate d'éthyle et eau) sont similaires entre eux et ne sont pas suffisamment avantageux sur le plan de l'activité antimicrobienne pour justifier le travail plus laborieux qu'ils impliquent. On peut conclure, à la vue de ces résultats, que l'extraction à l'acétate d'éthyle est viable sur le plan de l'activité antimicrobienne. Compte tenu de la simplicité de cette extraction, il sera recommandé de pivoter vers une extraction au solvant plutôt que de poursuivre avec la macération dans l'eau suivie d'une extraction liquide-liquide au solvant plus complexe.

3.2.4 Filtration

À la suite des analyses antimicrobiennes effectuées, une autre série d'analyses s'avérait nécessaire. En effet, la filtration appliquée à 0,45 µm a été faite par souci de facilité et de disponibilité des filtres. Cependant, en situation industrielle, une filtration à une porosité nominale si basse n'est pas réaliste puisque les filtres seraient rapidement bouchés et devraient être fréquemment remplacés. Il a donc été envisagé de filtrer à une porosité plus grande. Après avoir inventorié les filtres disponibles chez Kemitek, des porosités de 11 µm, 25 µm, et 50 µm ont été sélectionnées. Les échantillons ont été analysés suivant la même procédure que précédemment. Le graphique 3.9 suivant fait état des résultats :

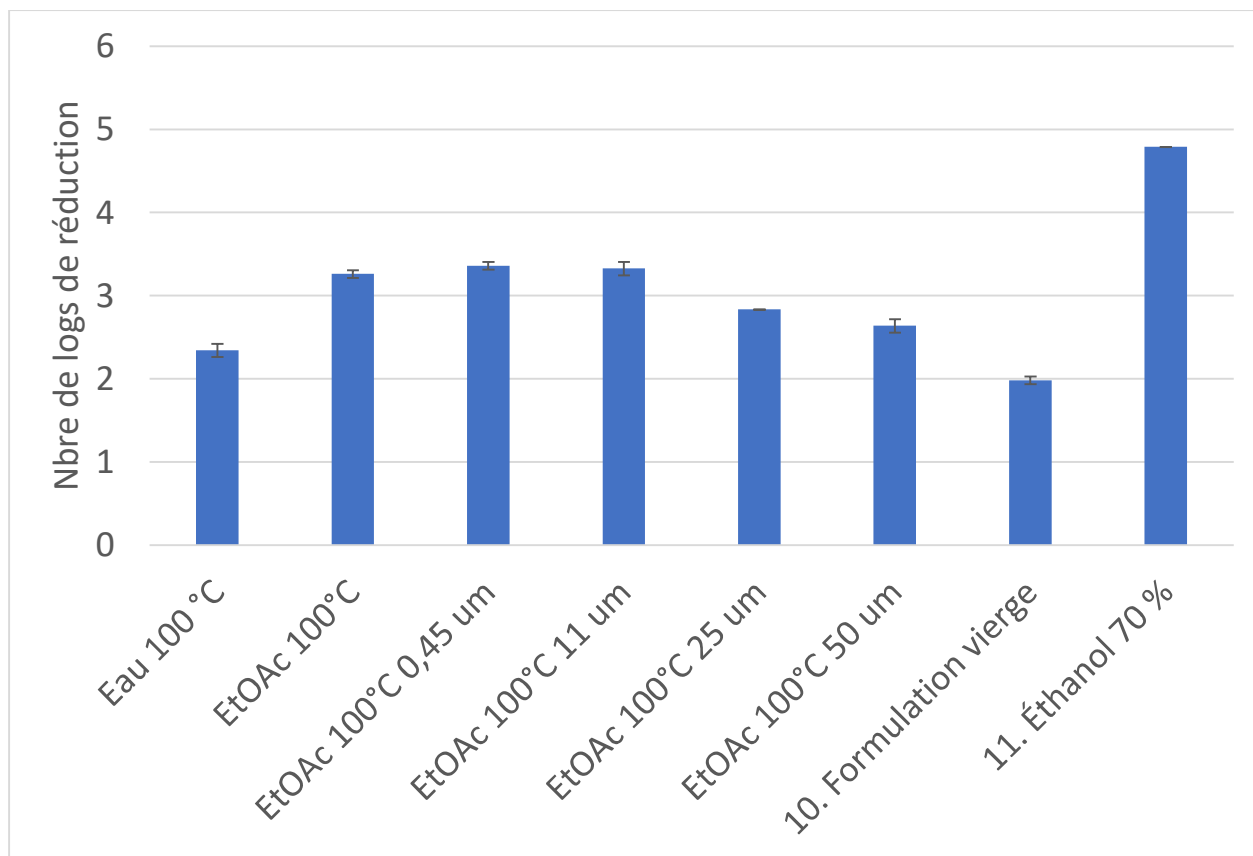


Figure 3.9 Réduction de l'activité microbienne par l'extrait au solvant à 100 °C suivant filtration

Avant toute chose, il est à noter que la valeur du log de réduction lorsque l'extrait 5 (acétate d'éthyle, 100 °C) est appliqué sur les microorganismes est grandement différente sur cette plaque (3,26) que sur la précédente (5,47). Cette différence apparaît malgré la normalisation des résultats, qui devrait justement éliminer ces variations de plaque en plaque. Il est impossible, avec les informations disponibles, de déterminer la cause de cette variation. Cette variation n'empêche toutefois pas d'observer les tendances importantes pour le présent travail.

De ces résultats, il est possible de conclure que la filtration à 0,45 µm et 11 µm n'ont pas d'effet néfaste sur l'activité antimicrobienne des extraits. Cependant, la filtration à 25 µm et 50 µm semble avoir un léger effet et abaisse les pouvoirs antimicrobiens des extraits. Il est contre intuitif de constater que le pouvoir antimicrobien décroît plus la porosité nominale est élevée. Il aurait été attendu que l'inverse se produise, c'est-à-dire que plus la porosité est faible, plus de composés sont éliminés de la solution et donc plus l'activité est faible. À ce stade, il n'est possible que d'émettre deux hypothèses. La première serait que des composés ayant une synergie sont ceux éliminés à haute porosité, amenant à la baisse d'activité

antimicrobienne des échantillons. La deuxième serait que des molécules plus volumineuses et inhibitrices sont filtrées à une porosité plus élevée, tandis que le reste de l'échantillon passe à travers des mailles. Des études plus poussées seraient nécessaires afin de pouvoir le confirmer ou l'infirmer. L'analyse par RMN du proton a toutefois été réalisée sur le résidu présent dans le filtre lors de la filtration à 50 μm . Le spectre RMN ^1H dans le méthanol deutéré de ce résidu a été obtenu à la figure 3.10 :

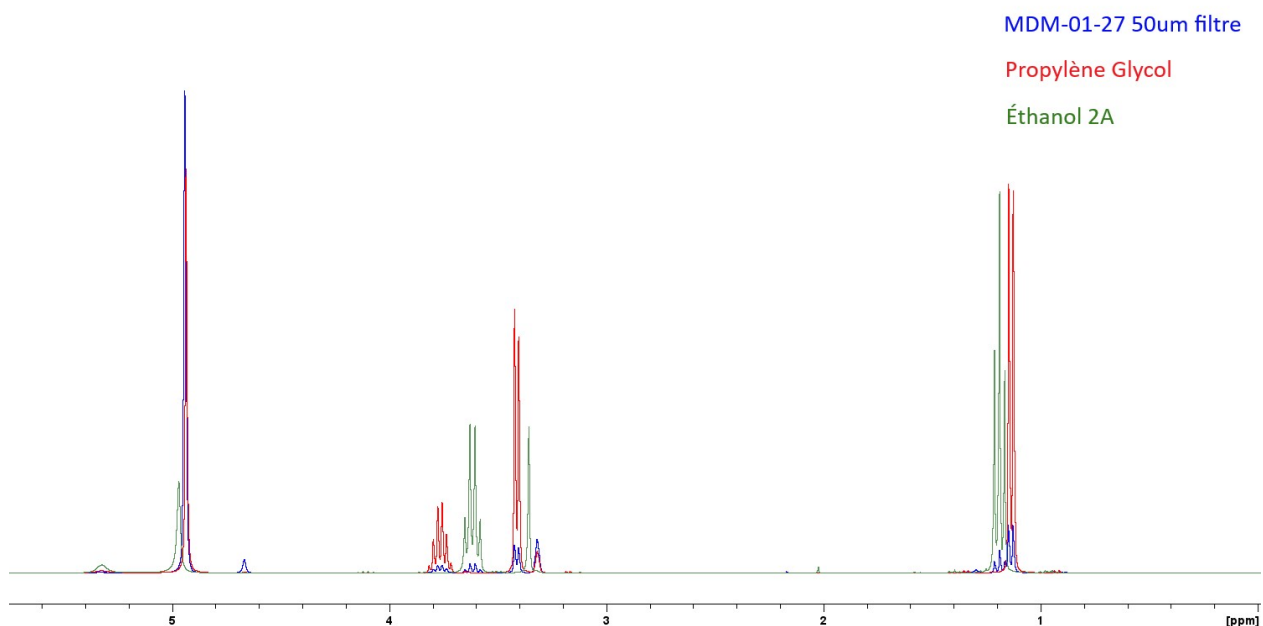


Figure 3.10 Spectre RMN ^1H du résidu de filtration à 50 μm de l'extrait # 5

À la vue de ce spectre RMN du résidu du filtre (en bleu), on ne peut tirer aucune conclusion puisque tous les signaux appartiennent aux composantes de la formulation vierge soit le propylène glycol (en rouge) et l'éthanol (en vert). Les résidus présents dans le filtre devront être analysés par d'autres méthodes si la nature des composés filtrés à 50 μm s'avère cruciale à la suite du projet. Cette décision sera laissée à la discrétion du regroupement d'experts pilotant le projet.

En somme, les études d'activité antimicrobienne démontrent que les extraits obtenus par extraction à l'acétate d'éthyle ont une activité similaire, sinon supérieure à celui obtenu selon le procédé original impliquant de l'eau. Compte tenu des rendements largement supérieurs et de la simplicité accrue des extractions repensées, le procédé au solvant est d'autant plus intéressant et prometteur. Pour la température d'extraction, 100 °C semble plus intéressant selon les mêmes critères, mais réaliser cette extraction, au-dessus du point d'ébullition de l'acétate d'éthyle requiert des réacteurs certifiés pour opérer aux pressions développées. De plus, la formulation de l'extrait avant application sur les pommes de terre devra être modifiée puisque l'extrait au solvant est chimiquement différent de l'original. Une filtration, idéalement à travers des filtres de porosité 25 µm ou 50 µm devra être réalisée tant que la procédure de formulation n'aura pas été modifiée. Un point négatif du nouveau procédé se présente comme l'absence de phase aqueuse pouvant être revalorisée en tant que biostimulant. Le projet visant le biostimulant ⁸⁹ étant dans ses débuts, le futur de celui-ci devra être réévalué par l'équipe de projet. Finalement, afin de pouvoir conclure que le nouveau procédé est vraiment la voie à suivre, il faut pouvoir évaluer l'avantage monétaire que cela représente. C'est ce qui sera étudié à la section suivante où une étude technico-économique sera déployée afin de comparer les procédés sur le plan des intrants, de l'énergie et de la main-d'œuvre impliquée.

3.3 Étude technico-économique

À la vue des résultats précédents d'extraction, la méthode au solvant s'avère prometteuse. Cependant, avant de pivoter vers cette nouvelle méthode, les partenaires se doivent d'étudier l'avantage économique que ce procédé d'extraction offre. Ce travail complexe vise à comparer l'ancien procédé, impliquant la production d'un jus de cuisson puis son extraction subséquente au solvant, à la nouvelle méthode développée dans le cadre du projet. Il est à noter qu'un travail complet prenant en compte tous les aspects d'une production peut à lui seul faire l'objet de plusieurs mois. L'objectif ici n'étant pas d'obtenir un prix absolu pour la production de cet extrait antimicrobien, mais d'obtenir un rapport de coût d'un procédé par rapport à l'autre, plusieurs hypothèses ont été posées. De plus, certains facteurs ont été complètement omis. Le point principal était de les appliquer des deux côtés de l'équation afin de ne pas biaiser les résultats. Notamment, toutes les données portant sur les coûts de construction d'usine, des immobilisations, d'installation, etc. communément appelées « CAPEX », n'ont pas été prises en compte. Les trois aspects évalués dans cette étude technico-économique sont les coûts en intrants, en énergie et en main-d'œuvre.

3.3.1 Aspects technico-économiques à l'étude

Le premier aspect, celui des intrants, est relativement facile à évaluer. Chaque matière utilisée dans le procédé d'extraction doit être soit achetée ou présente un coût de préparation non négligeable. Notamment, les écorces sont produites à partir de résidus de coupe forestière. Elles doivent être broyées, séchées et acheminées vers le lieu de traitement, ce qui peut s'avérer assez coûteux. Ces coûts ont été évalués à 0,43 \$/kg par le partenaire Innofibre, notamment par Nathalie Bourdeau, lors de leurs propres études technico-économiques internes qui n'ont pas fait l'objet de publications. C'est cette valeur qui sera utilisée pour les deux procédés. Ensuite, le solvant utilisé soit l'acétate d'éthyle, doit être obtenu en grandes quantités sous forme de baril, de réservoir en cage GRV (Grand Récipient pour Vrac) ou encore par camion-citerne. Le prix de cette matière est obtenu en 2024 par le partenaire Sani-Marc qui a confié le mandat à leur département d'approvisionnement puisqu'un industriel établi possède de meilleures connexions et un plus grand pouvoir d'achat. Ceci permet d'obtenir un prix beaucoup plus réaliste pour l'achat du solvant. Le prix de 2,90 \$/kg datant d'avril 2024 a été obtenu pour le format du réservoir GRV de 1000 L. Ce prix sera appliqué aux deux procédés lors des calculs.

Le coût de l'énergie est quant à lui plus complexe à déterminer. Au Québec l'hydroélectricité constitue la source principale d'énergie industrielle, en plus d'être relativement propre et abondante. Cependant, les multiples tarifs existants ⁹⁰ compliquent le tout. Afin d'obtenir un prix réaliste, il a été décidé d'utiliser le tarif de Kemitek, là où la production aurait lieu avant la construction d'une ligne de production dédiée chez un partenaire. Le tarif M ⁹¹ est utilisé chez Kemitek et selon une facture datant du 15 janvier 2024 à consulter à l'annexe G, la consommation était de 116400 kWh pour un montant facturé de 10902,72 \$, et ce pour une période de 31 jours. L'électricité chez Kemitek revient donc à 0,09366 \$/kWh ou 9,4 ¢/kWh. Ce taux sera appliqué aux calculs des coûts en énergie des procédés. Compte tenu du virage environnemental entamé par les industries et les sociétés en général, les équipements de chauffage seront censés être de nature électrique plutôt que d'utiliser le gaz naturel par exemple. Encore une fois, ceci est une hypothèse, mais qui sera appliquée pour les deux procédés. La comparaison des coûts des procédés demeure toujours valide.

Finalement, le coût de la main-d'œuvre chez Kemitek a été estimé à environ 50 \$/h par ouvrier. Ce prix est au coûtant, ce qui inclut le salaire brut et les avantages sociaux, mais ne comprend aucun profit pour l'entreprise. Étant donné que des opérations en présence de solvant inflammable ne doivent jamais être réalisées seul et ce par souci de sécurité, le coût total de la main-d'œuvre a été doublé à 100 \$/h. À chaque

étape du procédé, une valeur en temps de travail sera attribuée. Bien que dans l'industrie, un ouvrier est payé toute la journée, chez Kemitek le temps est facturé au projet travaillé. Si pendant une opération d'agitation, aucune attention n'est requise, l'ouvrier pourra s'affairer à d'autres tâches et ce temps ne sera pas facturé au projet d'extraction. Dans l'exercice présent, ce sont ces coûts qui sont étudiés. Les temps requis pour les opérations ont été évalués et confirmés par l'équipe de projet comprenant plus de quinze ans d'expérience dans l'usine pilote de Kemitek. Les données discutées sont compilées au tableau 3.6 suivant :

Taux estimés			
Réactifs	Prix (\$/kg)	Énergie (\$/kWh)	Main-d'œuvre (\$/h)
EtOAc	2,90	0,094	100
Écorces sèches	0,43		

Tableau 3.6 Taux obtenus et estimés des réactifs, de l'énergie et de la main-d'œuvre

3.3.2 Données énergétiques

En plus de ces données de coûts, il est nécessaire d'obtenir certaines informations de base quant aux demandes énergétiques des différentes étapes des procédés étudiés. Cette portion est réalisée par l'ingénieur attaché au projet soit Edwin Rodriguez présentement chargé de projet en ingénierie chez Kemitek. Après discussions, il a été déterminé que quatre valeurs doivent être extraites afin de procéder aux calculs. Ces valeurs seront ensuite introduites dans le calcul des coûts de chaque étape des procédés. Les valeurs calculées, en kilowattheures, sont les énergies nécessaires pour chauffer 100 kg d'acétate d'éthyle de 20 °C à 100 °C, chauffer 100 kg d'eau de 20 °C à 100 °C, évaporer 100 kg du solvant sous atmosphère réduite à une température de 50 °C et finalement, l'énergie nécessaire pour opérer un agitateur mécanique pendant une durée d'une heure. Les équations nécessaires ont été tirées d'ouvrages reconnus^{92 93} et ont eux aussi fait l'objet d'estimations informées⁹⁴. Notamment, l'efficacité des systèmes de chauffage est établie arbitrairement à 50 %^{95 96}. Dans un système chauffant à la vapeur ou à l'huile, d'importantes pertes sont observées et doivent être prises en compte. Quant à l'agitation, l'efficacité est établie à 88 %⁹³. Les résultats des calculs énergétiques sont présentés dans le tableau 3.7 suivant :

Opération	Chauffage	Chauffage	Évaporation	Agitation
Composante	Solvant	Eau	Acétate Éthyle	S.O.
T initiale [°C]	20	20	20	
T finale [°C]	100	100	50	
Masse [kg]	100	100	100	
Durée [h]				1
Puissance [kW]				3

Facteur de charge				50 %
DHv [J/mol]	S.O.	S.O.	52,94	
cP [J/kg · °C]	2000	4180	1936,22	
Q requis [J]	16000000	33440000	5868732,27	
Q requis [kJ]	16000	33440	5868,73	
Q requis [kWh]	4,44	9,29	1,63	1,50

Q additionnel
[kWh]

100

Efficacité	50 %	50 %	50 %	88 %
------------	------	------	------	------

Q demandé [kWh]	8,89	18,58	3,26	1,70
-----------------	------	-------	------	------

Tableau 3.7 Données énergétiques pour fin de calculs

On obtient donc ici les énergies nécessaires pour des étapes clés. Ces données seront utilisées lors des calculs et ajustées aux quantités en jeu. En détail, 8,89 kWh sont nécessaires pour chauffer 100 kg d'acétate d'éthyle de 20 °C à 100 °C. Pour la même opération, mais cette fois en utilisant de l'eau, on obtient 18,58 kWh d'énergie. Pour évaporer 100 kg du solvant à 50 °C sous atmosphère réduite, 3,26 kWh sont nécessaires. Finalement, un agitateur fonctionnant pendant une durée d'une heure nécessitera 1,70 kWh en apport énergétique. Ces informations constituent les bases communes des calculs qui suivront.

3.3.3 Procédé au solvant

Afin de construire les tables de calculs, il faut décortiquer les différentes étapes des procédés en jeu. Un organigramme est tout à fait adapté à cet objectif. L'organigramme 3.11 ci-dessous représente le nouveau procédé d'extraction au solvant :

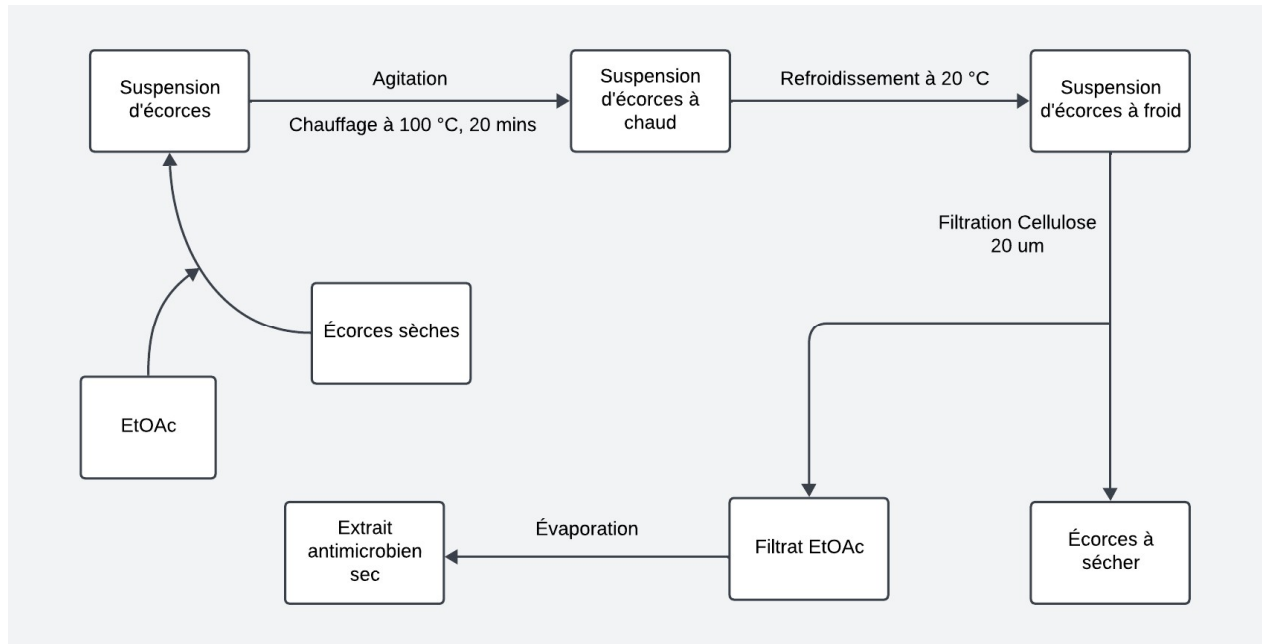


Figure 3.11 Organigramme du nouveau procédé d'extraction de l'agent antimicrobien

On y observe les différentes étapes du nouveau procédé. Le solvant d'extraction, ici l'acétate d'éthyle, est ajouté aux écorces sèches et le tout est agité pour obtenir une suspension d'écorces. La suspension est ensuite chauffée à 100 °C et maintenue à cette température pour une durée de 20 minutes. La suspension est refroidie à 20 °C et filtrée sur un filtre de cellulose d'une porosité de 20 µm. Compte tenu de la grosseur des écorces et de leur nature, un filtre industriel en polypropylène d'une porosité nominale plus grossière serait tout aussi efficace. Une fois le filtrat obtenu, il est complètement évaporé sous atmosphère réduite à 50 °C pour obtenir l'extrait antimicrobien solide désiré. De leur côté, les écorces recueillies lors de la filtration sont séchées au four afin d'éliminer toute trace de solvant. De cet organigramme, on peut ensuite décortiquer les étapes afin de clarifier les calculs sous forme de tableau. Celui-ci, ainsi qu'une colonne dédiée à la durée d'agitation sont présentés au tableau 3.8 ci-dessous :

Produit	Manipulation	Agitation (h)
Écorces sèches		(h)
	Ajout Acétate d'éthyle	
Écorces + solvant		
	Agitation pour suspendre	0,25
Suspension d'écorce dans le solvant		
	Chauffer à 100 °C + Agitation	2
Suspension d'écorce à chaud		
	Maintenir 20 minutes	0,33
Suspension d'écorce à chaud		
	Refroidissement à 20 °C + Agitation	2
Suspension d'écorce à RT		
	Filtration sur P8 (Cellulose 20 µm) sous vide	1
Filtrat (EtOAc + Extrait)		
	Évaporation du solvant (50 °C, atm réduite)	2
Concentré		
	Évaporation finale au four (50 °C), 48 h	
Extrait sec		
Écorces humectées de solvant		
	Séchage des écorces au four (50 °C)	
Écorces sèches		

Tableau 3.8 Étapes du nouveau procédé d'extraction et durée d'agitation

Ce tableau 3.8 sera utilisé comme base du chiffrer pour les calculs des coûts de chaque étape du procédé.

3.3.4 Exemple de calcul

De ce tableau, on peut ensuite calculer les coûts associés aux différents aspects étudiés selon les méthodes expliquées ci-dessous. Par exemple, si 10 kg d'écorces sont utilisés comme matière de départ, on multipliera leur coût de 0,43 \$/kg par la masse pour obtenir le coût total de 4,30 \$. Si du solvant doit être ajouté, on multipliera son prix à l'achat de 2,90 \$/kg par la masse nécessaire. Le total de tous les intrants sera additionné afin d'obtenir le prix total de cet aspect.

Ensuite, pour chauffer 150 kg de solvant de 20 °C à 100 °C, on multipliera la valeur de 8,89 kWh par 1,5 pour obtenir la demande énergétique de cette étape soit 13.335 kWh. De la même façon, la demande énergétique d'une agitation d'une durée de 15 minutes serait calculée en divisant la valeur de 1,70 kWh par 4 pour obtenir 0,425 kWh. Finalement, pour une étape comprenant le chauffage et l'agitation de solvant aux mêmes conditions que précédemment, il suffit d'additionner les valeurs d'énergie pour obtenir la demande énergétique totale de cette étape soit 13,76 kWh. Ce principe sera appliqué à chaque étape et finalement, toutes les énergies seront additionnées. Cette valeur totale sera alors multipliée par le coût de l'énergie en \$/kWh. La valeur en résultant sera le coût financier relevant de l'énergie utilisée pour cette extraction.

Quant aux heures de main-d'œuvre, le remplissage d'un réacteur évalué à 30 minutes sera facturé à raison de 0,5 heure multipliée par le taux horaire de 100 \$/heure. Cinquante dollars seront alors attribués à cette étape. Chaque étape sera calculée séparément et le total sera fait pour obtenir le coût total en main-d'œuvre de cette extraction.

Finalement, les trois aspects calculés doivent être additionnés. Cependant, afin de bien évaluer le coût de production par kilogramme d'extrait antimicrobien, il faut tenir compte de la masse d'extrait obtenue et diviser le coût total par cette masse en kilogrammes. Par exemple, si le coût de production s'élève à 3000 \$, mais que trois kilos de solide sont obtenus, il faut diviser le montant par trois pour obtenir le prix réel de production par kilo d'extrait soit 1000 \$.

Tout ce processus sera appliqué à l'ancien procédé, passant par un jus de cuisson à l'eau, et pour le nouveau procédé utilisant l'acétate d'éthyle dès le départ. De plus, les calculs seront répétés pour plusieurs échelles de production. Classiquement, augmenter l'échelle à laquelle l'extraction est réalisée devrait réduire le coût par kilogramme d'extrait sec. Il sera intéressant de comparer les deux procédés à

une échelle identique quant à leur coût de production. Autrement dit, comparer les coûts de production à une échelle donnée pour les deux procédés démontrera les avantages de l'un ou l'autre des procédés réalisés avec un équipement industriel donné.

3.3.5 Évaluation des coûts du procédé au solvant

Le tableau 3.9 suivant reprend les étapes du nouveau procédé présentées au tableau 3.4. Les évaluations des coûts y sont ajoutées.

Échelle		200 L		Demande en					
				Produits	Coûts (\$)	Énergie (kWh)	Coût (\$)	Travail (h)	Coût (\$)
Produit	Manipulation	Agitation (h)							
Écorces sèches		(h)	18,75	kg	8,06				
	Ajout Acétate d'éthyle		150,00	kg	435,00			0,5	50,00
Écorces + solvant									
	Agitation pour suspendre	0.25				0,426	0,04	0,25	25,00
Suspension d'écorce dans solvant									
	Chauffer à 100 °C + Agitation	2				15,436	1,45	1	100,00
Suspension d'écorce à chaud									
	Maintenir 20 minutes	0.33				0,563	0,05	0,5	50,00
Suspension d'écorce à chaud									
	Refroidissement à 20 °C + Agitation	2				15,436	1,45	1	100,00
Suspension d'écorce à RT									
	Filtration sur P8 (Cellulose 20 µm) sous vide	1				1,705	0,16	1	100,00
Filtrat (EtOAc + Extrait)			125,00	kg	0,00				
	Évaporation du solvant (50 °C, atm réduite)	2				7,085	0,67	2	200,00
Concentré									
	Évaporation finale au four (50 °C), 48 h							1	100,00
Extrait sec			1,00	kg					
Écorces humectées de solvant			32,45	kg	0,00				
	Séchage des écorces au four (50 °C)					0,529	0,05	1	100,00
Écorces sèches			16,22	kg	0,00				
TOTAL (\$/kg d'extrait sec)			443,06		3,87		825,00		

Tableau 3.9 Analyse technico-économique du nouveau procédé d'extraction de l'agent antimicrobien

Avec les données de ce tableau, le coût de production par kilogramme d'extrait peut être calculé. À noter que les quantités ont été ajustées pour obtenir 1 kg d'extrait solide final selon les données expérimentales récoltées. Bien qu'il faille normalement diviser les totaux de chaque aspect étudié par la masse d'extrait obtenue, dans le cas présent, ce calcul est simplifié par cet ajustement préalable des quantités.

À l'échelle du réacteur 200 L, 18,75 kg d'écorces à 0,43 \$/kg sont nécessaires pour un total de 8,06 \$. Il faut ensuite ajouter 150 kg d'acétate d'éthyle se détaillant à 2,90 \$/kg pour un coût en solvant de 435,00 \$. Pour les produits, le total des coûts s'élève donc à 443,06 \$. Les 125 kg de solvant notés à la filtration ainsi que les 32,45 kg d'écorces humectées de solvant ne doivent pas être comptés comme une dépense puisque ce sont les quantités obtenues après les opérations et non pas un ajout additionnel. Ces valeurs sont nécessaires aux calculs d'énergie et de main-d'œuvre. La masse d'écorces humectées d'acétate d'éthyle s'élève à 32,45 kg. De cette masse, environ 50 % proviennent du solvant. Une fois séchés, 16,22 kg d'écorces sont récupérés pour une récupération de 86,53 % comme mentionné à la section 3.3. Il serait possible d'attribuer un prix aux écorces humectées ou sèches obtenues à la fin du procédé selon le prix de revente de cette matière pour la génération d'énergie. Le prix serait alors compté comme négatif afin de le soustraire au procédé total. Cependant, cette donnée n'est pas disponible puisqu'il faudrait calculer la teneur énergétique, ce qui n'a pas été obtenu dans le cadre du projet.

Pour l'énergie, les coûts de chaque étape sont additionnés pour un total de 44,192 kWh. À un taux de 0.094 \$/kWh, cela revient à 3,87 \$. Ce coût est négligeable si on considère le coût total du procédé. Finalement, au total, 8,25 heures de travail ont été évaluées comme nécessaires pour réaliser cette extraction. À un taux horaire de 100 \$/h, cela revient à 825,00 \$. Finalement, le total global de cette opération s'élève à 1272,21 \$ pour produire un kilo d'extrait antimicrobien sec. Ce coût, quand même assez élevé même si le produit n'est pas utilisé pur lors du traitement, aurait avantage à être réduit en augmentant l'échelle à laquelle l'extraction est réalisée.

Si l'on applique les mêmes calculs aux autres échelles de réacteurs disponibles chez Kemitek, on obtient les coûts par kilogramme d'extrait, selon le nouveau procédé au solvant, présentés au tableau 3.10 suivant :

Échelle (L)	Coûts totaux (\$)	Quantité d'extrait (kg)	Coût (\$/kg d'extrait sec)
200	1272,91	1	1272,21
400	1918,54	2	959,27
800	3039,52	4	759,88
4000	10190,00	20	509,50

Tableau 3.10 Comparaison des coûts d'extraction du nouveau procédé à différentes échelles

Les dépenses engendrées pour produire un kilogramme d'extrait s'étendent de 509,50 \$ à 1272,21 \$ tout dépendant l'échelle impliquée. Évidemment, lorsque l'échelle est augmentée, les coûts de production sont réduits. Il est donc recommandé de travailler à la plus grande échelle possible lorsque le but est une production à moindre coût.

3.3.6 Évaluation des coûts du procédé original à l'eau

Quant au procédé original impliquant un jus de cuisson suivi d'extractions au solvant, les étapes sont plus nombreuses comme le démontre l'organigramme 3.12 suivant :

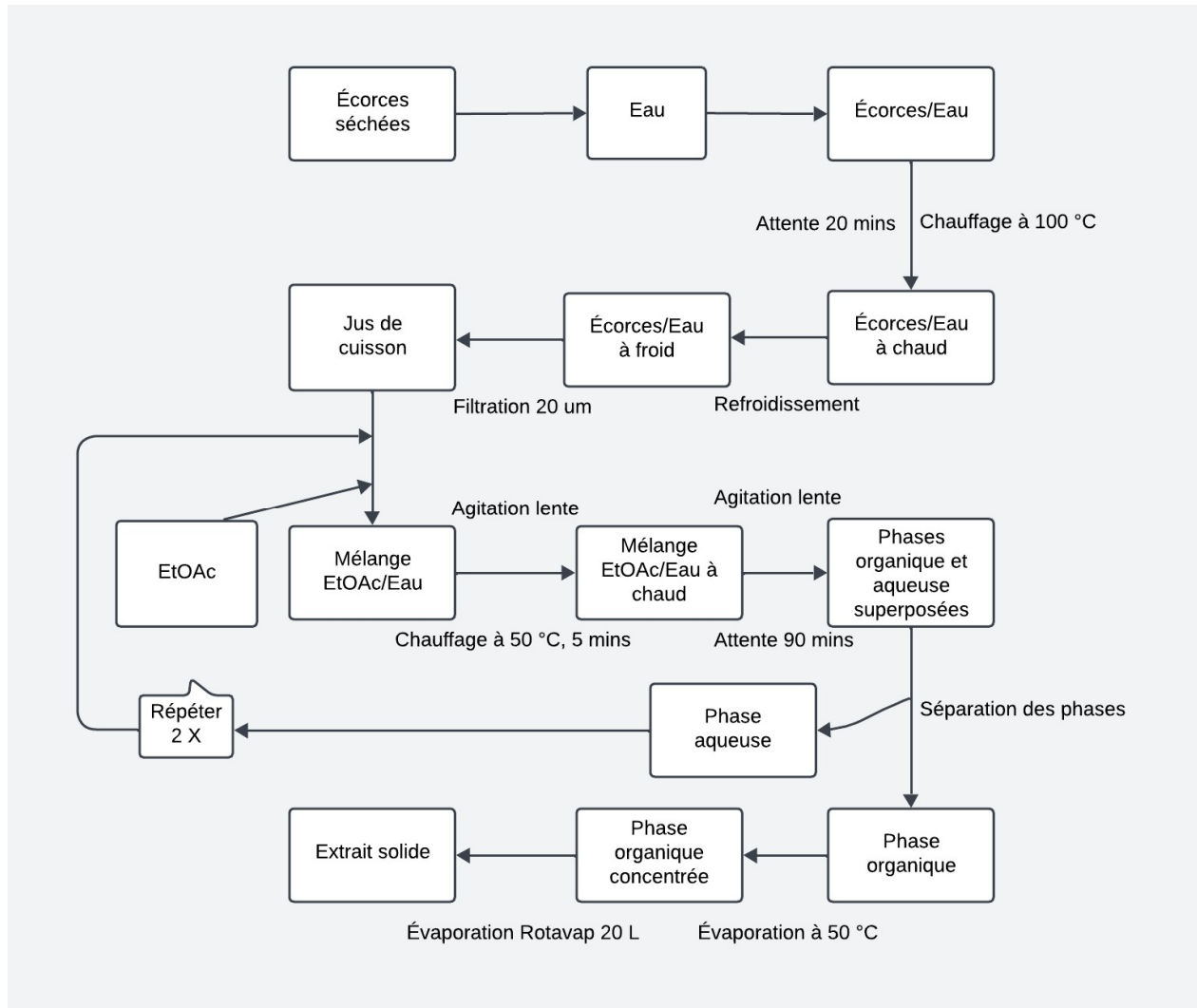


Figure 3.12 Organigramme de l'ancien procédé d'extraction de l'agent antimicrobien

Les étapes sont reprises sous forme de tableau comme précédemment. Les évaluations des coûts de chaque étape sont présentées aux tableaux 3.11 et 3.12 suivants :

Échelle 200 L			Demande en						
Produit	Manipulation	Agitation	Produits		Coûts (\$)	Énergie (kWh)	Coût (\$)	Travail (h)	Coût (\$)
Écorces sèches			75,00	kg	32,25				
	Ajout eau		80,00	kg				0,25	25,00
Écorces + eau									
	Agitation pour suspendre	0,25				0,426	0,04	0,25	25,00
Suspension d'écorce dans eau									
	Chauffer à 100 °C + Agitation	2				18,271	1,72	1,0	100,00
Suspension d'écorce à chaud									
	Maintenir 20 minutes	0,33				0,563	0,05	0,5	50,00
Suspension d'écorce à chaud									
	Refroidissement à 20 °C + Agitation	2				18,271	1,72	1,0	100,00
Suspension d'écorce à RT									
	Filtration sur P8 (Cellulose 20 µm) sous vide	1				1,705	0,16	1,0	100,00
Jus de cuisson			80,00	kg					
	Ajout Acétate d'éthyle		88,50	Kg	256,65			0,5	50,00
Jus de cuisson + solvant									
	Chauffer à 50 °C + Agitation	1				13,069	1,23	1,0	100,00
Mélange biphasique à chaud									
	Agitation lente pour 90 minutes	1,5				2,557	0,24	0,5	50,00
Phases organiques et aqueuses									
	Séparation des phases							0,5	50,00
Phase aqueuse									

Tableau 3.11 Analyse technico-économique du procédé original d'extraction de l'agent antimicrobien

	Ajout Acétate d'éthyle		88,50	Kg	256,65				0,5	50,00
Jus de cuisson + solvant										
	Chauffer à 50 °C + Agitation	1				5,638	0,53		1,0	100,00
Mélange biphasique à chaud										
	Agitation lente pour 90 minutes	1,5				2,557	0,24		0,5	50,00
Phases organiques et aqueuses										
	Séparation des phases								0,5	50,00
Phase aqueuse										
	Ajout Acétate d'éthyle		88,50	kg	256,65				0,5	50,00
Jus de cuisson + solvant										
	Chauffer à 50 °C + Agitation	1				5,638	0,53		1,0	100,00
Mélange biphasique à chaud										
	Agitation lente pour 90 minutes	1,5				2,557	0,24		0,5	50,00
Phases organiques et aqueuses										
	Séparation des phases								0,5	50,00
Phase organique										
	Évaporation du solvant (50 °C, atm réduite)	4	265,50			8,656	0,81		4,0	400,00
Concentré										
	Évaporation à l'évaporateur rotatif (50 °C)								2,0	200,00
Concentré II										
	Évaporation finale au four (50 °C), 48 h								2,0	200,00
Extrait sec			0,44	kg						
Écorces humectées d'eau			129,80	kg						
	Séchage des écorces au four (50 °C)					1,012	0,10		1,00	100,00
Écorces sèches			64,90	kg						

TOTAL (\$/kg d'extrait sec)

1823,18

17,29

4659,09

Tableau 3.12 Analyse technico-économique du procédé original d'extraction de l'agent antimicrobien – Suite

Suivant le même raisonnement appliqué au nouveau procédé au tableau 3.9, les coûts de chaque volet ont été calculés.

À l'échelle du réacteur 200 L, 75 kg d'écorces à 0,43 \$/kg sont nécessaires pour un total de 32,25 \$. Il faut ensuite ajouter 80 kg d'eau. Pour cette manipulation, l'eau de ville est adéquate et aucun coût n'y est donc associé. Pour les extractions au solvant, trois portions de 88,5 kg sont ajoutées au jus de cuisson suivi d'une séparation liquide-liquide. Ces trois portions d'acétate d'éthyle totalisant 265,5 kg se détaillent à 769,95 \$. Le total des produits est donc de 802,20 \$. Étant donné que ces quantités ne produisent que 0,44 kg d'extrait sec, il faut diviser ce montant par la masse d'extrait produite afin d'obtenir le coût par kilogramme d'extrait sec à cette échelle, et ce dans le but de pouvoir comparer les différentes échelles. Un total pour les intrants de 1823,18 \$ est alors obtenu. Comme dans le procédé précédent, les volumes de jus de cuisson et de solvants récupérés ne doivent pas être facturés comme des intrants. Ils sont cependant nécessaires aux calculs d'énergie et de main-d'œuvre qui suivront. La masse d'écorces humectées d'eau s'élève à 129,80 kg. De cette masse, environ 50 % proviennent de l'eau. Une fois séchés, 64,90 kg d'écorces sont récupérés pour une récupération de 86,53 % comme mentionné à la section 3.3. Il serait possible d'attribuer un prix aux écorces humectées ou sèches obtenues à la fin du procédé selon le prix de revente de cette matière pour la génération d'énergie. Le prix serait alors compté comme négatif afin de le soustraire au procédé total. Cependant, cette donnée n'est pas disponible puisqu'il faudrait calculer la teneur énergétique, ce qui n'a pas été obtenu dans le cadre du projet.

Pour l'énergie, les coûts de chaque étape sont additionnés pour un total de 80,92 kWh. À un taux de 0,094 \$/kWh, cela revient à 7,61 \$. Puisque 0,44 kg d'extrait sont produits, il faut ramener ce montant par kilo d'extrait sec. On obtient donc 17,29 \$. Ce coût est négligeable si on considère le coût total du procédé.

Finalement, au total, 20,50 heures de travail ont été évaluées comme nécessaires pour réaliser cette extraction. À un taux horaire de 100 \$/h, cela revient à 2050,00 \$. Ajusté au kilo d'extrait sec, c'est 4659,09 \$ qui doit être attribué à la main-d'œuvre. Finalement, le total global de cette opération s'élève à 6499,56 \$ pour produire un kilo d'extrait antimicrobien sec. Ce coût, très élevé même si le produit n'est pas utilisé pur lors du traitement, aurait avantage à être réduit en augmentant l'échelle à laquelle l'extraction est réalisée. Si l'on applique les mêmes calculs aux autres échelles de réacteurs disponibles chez Kemitek, on obtient les coûts par kilogramme d'extrait, selon l'ancien procédé, présentés au tableau 3.13 suivant :

Échelle (L)	Coûts totaux (\$)	Quantité d'extrait (kg)	Coût (\$/kg d'extrait sec)
200	2859,81	0,44	6499,56
400	4067,52	0,88	4622,18
800	6482,94	1,76	3683,49
4000	21806,31	8,80	2477,99

Tableau 3.13 Comparaison des coûts d'extraction du procédé original à différentes échelles

Aux échelles de 200 L, 400 L, 800 L et 4000 L, les quantités de produits obtenues sont de 0,44 kg, 0,88 kg, 1,76 kg et 8,80 kg respectivement. Il en coutera d'ailleurs, selon les aspects étudiés, 6499,56 \$, 4622,18 \$, 3683,49 \$ et 2477,99 \$ par kilogramme respectivement selon les échelles. On observe une baisse notable du coût avec l'augmentation de l'échelle. Si le client désirait une production de l'agent antimicrobien, le réacteur de 4000 L serait plus rentable économiquement et c'est celui qui serait proposé. De plus, selon les masses d'extrait sec obtenu et d'écorces utilisées énumérées ci-haut, ce procédé nécessite 170,45 kg d'écorce par kilo d'extrait sec obtenu. Comparativement au nouveau procédé, les coûts sont nettement plus élevés.

3.3.7 Comparaison des échelles

En comparant les coûts des deux procédés aux différentes échelles étudiées et disponibles pour la production chez Kemitek, on obtient les rapports du tableau 3.14 suivant :

Échelle	(L)	200	400	800	4000
Coûts du procédé nouveau	(\$/kg)	1272,91	959,27	759,88	509,50
Coûts du procédé original	(\$/kg)	6499,56	4622,18	3683,49	2477,99
Rapport des coûts	(Nouveau/original)	5.11	4.82	4.85	4.86

Tableau 3.14 Rapports des coûts de production entre l'ancien et le nouveau procédé aux différentes échelles

À la vue de ces données, il est possible de conclure le nouveau procédé proposé est environ cinq fois plus avantageux monétairement que l'ancienne méthode. De plus, ce nouveau procédé présente d'autres avantages. Notamment, il comporte moins d'étapes et est moins laborieux que l'original. Il offre un rendement 2,27 fois supérieur à une échelle donnée et nécessite environ 10 fois moins d'écorces pour la même quantité d'extrait sec final. Finalement, comme mentionné précédemment, son activité antimicrobienne est similaire, voire supérieure à l'extrait original.

CONCLUSION

Dans ce travail, il a été question de la synthèse de l'acétate d'isobornyle (4) en vue de l'utiliser comme agent antigerminatif pour la pomme de terre durant son stockage afin de remplacer un produit récemment banni à travers l'Union européenne soit le chlorprophame ou CIPC. Avant de débiter les travaux sur les synthèses, les réactifs de départ ont été acquis et caractérisés par de multiples méthodes analytiques. Le suivi des réactions était rendu possible grâce à ces analyses qui ont permis d'isoler les signaux caractéristiques des molécules à l'étude, notamment par RMN ^1H . La chromatographie gazeuse en phase chirale a aussi été mise à contribution afin d'identifier et de quantifier les différents énantiomères des réactifs. Toutes ces informations analytiques ont mené à la détermination de la composition de la térébenthine fournie par une industrie œuvrant dans le domaine des pâtes et papier. Cette térébenthine désodorisée par oxydation à l'hypochlorite de sodium contenait 85 % de molécules utiles aux réactions projetées soit le α -pinène (1) et le β -pinène (2). Les réactions chimiques impliquées dans ce projet ont ensuite pu être étudiées à l'aide des outils précédemment développés.

En premier lieu, l'isomérisation du α -pinène (1) et du β -pinène (2) en camphène (3) a été étudiée. Cette réaction nécessitait la confection d'un catalyseur non disponible commercialement. En l'occurrence, des nanotubes d'oxyde de titane ont été fabriqués en dissolvant le TiO_2 anatase commercial en nanopoudre dans une solution d'hydroxyde de sodium chauffée. La croissance des tubes s'échelonnait sur une durée de 24 à 48 heures selon la source d'oxyde de titane sélectionnée. À la suite d'un lavage acide, le catalyseur a été examiné par microscopie électronique à transmission pour confirmer la structure. Des tubes de diamètre d'environ 10 à 20 nm et de longueur de 100 à 500 nm ont été observés. Des catalyseurs alternatifs ont été envisagés tels que l'acide chlorhydrique, une zéolite modifiée ainsi que les poudres d'oxyde de titane traitées ou non à l'acide. Cependant, aucune de ces alternatives ne présentait la réactivité des nanotubes de titane. Il est à noter ce catalyseur n'est pas au point et des travaux additionnels seraient nécessaires pour bien maîtriser leur confection. Les lavages à l'acide, l'utilisation d'oxyde de titane de grade technique et la stabilité de ce catalyseur sont des points cruciaux régissant l'activité. De plus, la possible régénération de ces nanotubes devra être envisagée afin de réduire les coûts et les efforts reliés à sa confection.

À l'aide d'un lot performant de ce catalyseur, la réaction a été étudiée sous plusieurs angles. Notamment, la charge catalytique nécessaire à la conversion a été déterminée. Des essais ont montré qu'une charge

de 5 % massique des nanotubes d'oxyde de titane par rapport au α -pinène (1) était idéale. Quant à la température, trois températures ont été testées soit 100 °C, 120 °C et 140 °C. La température choisie pour la réaction fut 140 °C puisque celle-ci permettait d'augmenter drastiquement la vitesse de la réaction. Cependant, une plus haute température augmente aussi le risque de réactions parasites dont la formation d'oligomères de terpènes. À ce titre, une température de 120 °C serait aussi viable industriellement, quitte à augmenter le temps de réaction. Ensuite, un montage de chimie en continu muni d'un réacteur à lit fixe (*Fixed bed reactor* de l'anglais) a été développé afin d'étudier la réaction selon cette méthode. La réaction d'isomérisation a été menée à 140 °C et suivant la conversion, un temps de contact de 30 minutes était suffisant pour convertir le α -pinène (1) en camphène (3) à 99 %. La purification du mélange réactionnel a été réalisée par un montage de distillation classique. Les conditions idéales afin de distiller le camphène étaient une température de 70 °C et une pression réduite à 10 torrs. Quant à la térébenthine, elle a aussi été soumise aux conditions d'isomérisation. En sommes, son comportement était similaire au α -pinène (1) à la différence que la conversion était plus lente. Dans son cas, un temps de résidence de 60 minutes était nécessaire. Ceci est probablement dû aux différentes molécules présentes dans ce mélange de réactifs.

En deuxième lieu, la réaction d'estérification du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) a été étudiée. Celle-ci fonctionne sous le mécanisme du réarrangement de Wagner-Meerwein en présence d'acide acétique et d'un catalyseur acide polymérique soit la résine « Amberlyst 15 dry » de DuPont. Certains paramètres ont été étudiés en prévision de la transposition à un système de chimie en continu. Notamment, les équivalents d'acide acétique ont été optimisés. Le nombre idéal d'équivalents d'acide acétique afin de maximiser la vitesse et la complétion de la réaction et de minimiser les équivalents excédentaires était de deux. De plus, lorsque la température a été augmentée, une complétion plus faible de la réaction a été observée. Ceci a été expliqué par l'énergie de Gibbs qui s'avérait modifiée et déplaçait l'équilibre vers les réactifs lorsque la température était croissante. Les informations tirées de ces essais ont montré que lorsque la complétion avait atteint environ 80 %, il était avantageux de réduire la température de la réaction afin de pousser l'équilibre vers les produits. Ensuite, la réaction a été adaptée à la chimie en continu. Des modifications ont été apportées au montage développé précédemment pour la réaction d'isomérisation. Par exemple, le nouveau montage permettait maintenant de mener la réaction à deux températures consécutives. Puisque le catalyseur solide utilisé était différent de celui pour l'isomérisation, la porosité d'une cartouche remplie de ce dit catalyseur a été calculée, ce qui a mené à la détermination des temps de résidence selon le débit appliquée par la pompe. Les températures idéales de

réaction ont été étudiées. Dans cette étude, deux cartouches à températures différentes étaient utilisées en série. La température de la première cartouche a été variée, tandis que la température de la seconde a été maintenue à 20 °C. Dans le but de minimiser le temps de contact nécessaire, les températures idéales ont été fixées à 40 °C et 20 °C pour les deux cartouches de catalyseur. À ces températures, un temps de résidence de 10 minutes était suffisant pour obtenir une complétion presque totale de la réaction. Par la chimie en continu, d'autres options ont été explorées. Notamment, l'application d'ultrasons à la réaction a montré que ceux-ci pouvaient augmenter la vitesse de la réaction. Une réaction à 20 °C sous ultrasons était aussi rapide que la réaction menée à 40 °C et 20 °C sans l'application des ultrasons. Lorsque les paramètres idéaux ont été déterminés, une production d'acétate d'isobornyle (4) a été réalisée par la chimie en continu. Cette production, en plus de fournir une quantité appréciable de mélange réactionnel pour fin de purification, a permis de déterminer la capacité de catalyse de la résine Amberlyst 15. Il a été calculé que chaque kilogramme de résine pouvait convertir 255 kg de camphène (3) en 367 kg d'acétate d'isobornyle (4). En vérité, cette valeur est fort probablement sous-estimée, puisque la production a dû être stoppée par manque de réactifs. Finalement, la méthode de purification du mélange réactionnel à privilégier a été déterminée. Plusieurs méthodes ont été étudiées, dont l'extraction liquide-liquide sans et avec solvant (Heptane ou acétate d'éthyle) ainsi que la distillation. La méthode la plus avantageuse s'est avérée être la distillation classique. En plus de présenter un rendement de 90 % et une pureté finale du produit de 96 %, cette méthode permet de récupérer le camphène (3) et l'acide acétique non réagis et de les réintroduire dans le processus, augmentant l'efficacité totale du procédé. Cette manœuvre a aussi comme effet de réduire les coûts de réactifs, puisque l'équivalent en excès d'acide organique est réutilisé pour l'estérification du camphène (3).

Dans l'étude de ces réactions, et puisque les réactifs utilisés étaient composés d'énantiomères, il était important de déterminer la nature chirale des molécules synthétisées. À la suite des essais planifiés, il a été déterminé que l'acétate d'isobornyle (4) synthétisé serait toujours un mélange racémique des diastéréoisomères de cette molécule puisque la réaction d'estérification du camphène (3) était racémisante. La composition énantiomérique de la matière première, soit la térébenthine, n'avait donc aucun impact sur le produit fini. Il n'était d'ailleurs pas nécessaire de contrôler ce paramètre lors d'une production industrielle.

Une preuve de concept a aussi été réalisée afin de démontrer la faisabilité du processus, lorsqu'appliqué à la matière première visée soit la térébenthine. L'élaboration du plan d'expérience a été testée sur le α -pinène (1). Ensuite, la térébenthine a subi le même traitement. Les conversions, puretés et rendements ont été calculés à chaque étape par leur méthode respective pour les réactions d'isomérisation, d'estérification et pour les distillations moyennes et finales. Le cumulatif des rendements a démontré qu'à partir de 1 kg de térébenthine désodorisée, il est possible d'obtenir 0,55 kg de camphène (3) qui peut à son tour être estérifié en 0,67 kg d'acétate d'isobornyle (4). Ces essais ont révélé qu'une distillation finale, suivant l'isomérisation et l'estérification des réactifs, était suffisante afin d'obtenir un produit d'une pureté au-delà de 95 %. L'élimination d'une étape de purification est avantageuse lors de l'implantation de la production dans une usine. Ce sont des équipements, des coûts et des efforts en moins qui à leur tour, augmenteront la rentabilité de ce procédé industriel.

En dernier lieu, ayant étudié les réactions, déterminé les conditions réactionnelles, confirmé le chemin synthétique chiral et ayant démontré que le procédé en son entier était plausible, le coût de production de l'acétate d'isobornyle (4) a été calculé. Pour y arriver, les coûts actuels des réactifs et catalyseurs ont été obtenus par des fournisseurs crédibles et établis dans le domaine. Ensuite, chaque étape a été étudiée quant aux quantités nécessaires et les coûts en découlant ont été additionnés. Cet exercice a permis d'établir le coût de production de l'acétate d'isobornyle (4) à 10,74 \$ par kilogramme seulement pour les réactifs nécessaires aux synthèses. En ajoutant les estimations comptabilisant les équipements, les salaires, le local et le profit, ce coût augmente à 18,98 \$ par kilogramme de produit. Comparativement au marché asiatique moyen pour l'acétate d'isobornyle (4) à 20,00 \$/kg, la valeur obtenue est assez réaliste et potentiellement profitable. Selon des tests effectués par les partenaires, la concentration d'acétate d'isobornyle (4) nécessaire pour traiter les pommes de terre avoisine les 200 parties par million (ppm). À cette concentration, le coût de traitement d'une tonne de pommes de terre s'élève à 3,80 \$. Comparativement, le chlorprophame (CIPC), produit actuellement utilisé chez le client, se détaille à environ 4,83 \$ par tonne de pommes de terre à traiter. Le procédé développé dans cette étude s'avère donc compétitif sur le marché et pourrait très bien être adopté par l'industrie si l'interdiction d'utilisation du CIPC gagnait les côtes de l'Amérique du Nord.

Plusieurs questions et problématiques subsistent cependant. En plus des travaux sur le catalyseur d'isomérisation énumérés plus haut, le mécanisme d'action de l'acétate d'isobornyle (4) pour empêcher la germination n'est pas encore totalement élucidé. Ce travail a été fait par une étudiante affiliée au projet

et nécessitera probablement de plus amples efforts. Une méthode d'application sécuritaire du produit et la fréquence d'application doivent aussi être déterminées et les effets néfastes à long terme, s'il y en a, devront être identifiés et mitigés. Le but de ce travail était ultimement d'étudier les réactions sous plusieurs coutures afin de fournir des informations pratiques pertinentes aux producteurs industriels potentiels. La production d'acétate d'isobornyle (4) à partir de la térébenthine issue de l'industrie des pâtes et papier dans le but d'être utilisée comme agent antigerminatif a été démontrée dans ce travail.

Enfin, en ce qui a trait au développement d'un traitement antimicrobien efficace envers les maladies affligeant les pommes de terre durant leur stockage, un extrait actif a été fractionné par chromatographie sur colonne de C18 supporté sur silice. Des informations additionnelles sur la nature des fractions les plus actives sur le plan antimicrobien ont été obtenues grâce à la RMN HSQC. Ces informations ont été transmises à l'équipe de projet afin de guider leur enquête quant à la composition exacte de l'extrait actif. Parallèlement, le procédé d'extraction a été amélioré par l'utilisation de l'acétate d'éthyle plutôt que de débiter avec une macération dans l'eau suivie d'une extraction liquide-liquide. La température optimale a été déterminée à la suite d'une courte étude dans laquelle différentes conditions expérimentales ont été appliquées. Une température de 100 °C pour une durée de 20 minutes a été sélectionnée à la suite de la vérification des activités antimicrobiennes des extraits obtenus. Finalement, l'extraction au solvant a été comparée à l'originale quant aux coûts impliqués lors d'une étude technico-économique. Les coûts en intrants comme le solvant et les écorces, en énergie dépensée lors du chauffage et agitation ainsi qu'en ressources humaines nécessaires aux opérations sont les trois aspects qui ont été étudiés. Pour chaque procédé, le coût total par kilogramme d'extrait produit a été calculé pour plusieurs échelles expérimentales. Le rapport des totaux, aux mêmes échelles du nouveau procédé sur l'ancien indique que le nouveau procédé est environ cinq fois plus avantageux par kilogramme d'extrait sec obtenu. À la lumière des études effectuées, les avantages du nouveau procédé au niveau de la simplicité des opérations, de l'activité accrue le nouveau procédé au solvant organique a été recommandé à l'équipe de projet pour la suite des travaux.

Le volet portant sur l'antimicrobien sera poursuivi dans un projet conjointement entre les différents centres de recherche impliqués afin de déterminer la composition exacte de l'extrait en vue de le faire accepter par les instances gouvernementales concernées. Ces travaux pourront, si le besoin se fait sentir, être confiés à un(e) futur(e) étudiant(e) à la maîtrise ou au doctorat à l'UQTR. De plus, un extrait à grande échelle sera produit dans les installations de Kemitek suivant le nouveau procédé et le solide obtenu sera

envoyé chez les partenaires pour analyses de toxicité selon différentes voies et de son activité détergente. Si les résultats sont concluants, il est raisonnable d'affirmer que le procédé au solvant organique sera officiellement adopté pour la suite et que le sous-projet portant sur le biostimulant sera complètement abandonné. Les travaux effectués feront grandement avancer le développement de ce traitement antimicrobien et il est fortement espéré que les pommes de terre du Québec seront traitées dans un avenir à moyen terme. La conservation des tubercules sera grandement améliorée, les pertes dues à la pourriture seront réduites et le rendement de culture de cet aliment phare s'en verra augmenté.

Il est le souhait de tous ceux impliqués au projet que la conservation des aliments soit réalisée par des traitements issus de la biomasse et plus sécuritaires pour l'être humain plutôt que des traitements impliquant des composés synthétiques de nature pétrolière. Les biomasses québécoise et canadienne, par leur contribution à combattre les patatopathologies, méritent fortement d'être valorisées davantage qu'elles ne le sont présentement, et ce dans l'optique d'améliorer notre efficacité en économie circulaire.

ANNEXE A

Méthode expérimentale

1. Produits chimiques et solvants

Les produits chimiques commerciaux ont été obtenus de fournisseurs courants en chimie notamment de chez Sigma-Aldrich, Fischer Scientific et Oakwood Chemicals. Le grade ACS a été privilégié lorsque possible et nécessaire. Sinon, une pureté de plus de 95 % était exigée afin d'éviter les contaminants et complexifier les réactions. Les acides comme l'acide chlorhydrique et l'acide acétique ont été de grade concentré ACS et glacial respectivement.

Les solvants de réaction ont été obtenus du distributeur local et usuel de Kemitek à Thetford Mines soit Solutions Chemco. Le grade technique a été privilégié afin de garder les coûts au plus bas et par souci de disponibilité. Chaque contenant était analysé par RMN ^1H avant usage dans le but de déceler toute contamination.

Les solvants RMN, notamment le méthanol deutéré (CD_3OD) et le chloroforme deutéré (CDCl_3), ont été obtenus de Sigma-Aldrich et Oakwood Chemicals, sans TMS (Tétramethylsilane) et de pureté 99,5 % ou plus.

2. Spectroscopie infrarouge (FTIR)

Fabricant : Agilent Technologies

Modèle : Cary 630

Module d'analyse : ATR

Acquisition : Microlab PC

Traitement : SpectraGryph 1.2



3. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Fabricant : Bruker

Modèle : Fourier 300

Fréquence : 300,19 MHz

Sonde : ^1H et ^{13}C

Tubes : 5 mm

Température d'analyse : 20 °C

Logiciel d'analyse : Topspin version 3.1

Solvant : Chloroforme deutéré (CDCl_3) sauf si
indiquer autrement



4. Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur par ionisation de flamme sur colonne chirale (GC-FID)

Fabricant : Hewlett Packard

Modèle : G1530A

Injection : directe

Température d'injection : 200 °C, 1 μL

Colonne : Agilent Cyclosil-B, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μm

Détecteur : FID, 250 °C

Programme de température :

Rampe (°C/min)	Température (°C)	Temps (min)
	40	5
2	190	5
50	40	5



5. Microscopie électronique à balayage couplée à un détecteur de spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (SEM-EDX)

Fabricant : Hitachi

Modèle : SU1510 VP-SEM

Voltage : 15.0 kV à 20.0 kV

Agrandissement : 5000 X à 10000 X

Électrons : Diffusés (Scattering)

EDX : Oxford Instruments X-Max 20 mm²



6. Microscopie électronique en transmission (TEM)

Fabricant : Philips

Modèle : EM 208S

Voltage : 70.0 kV

Agrandissement : 14000 X à 140 000 X



7. Séparation automatisée sur colonne de silice

Fabricant : Biotage

Modèle : Selekt

Colonne : Buchi FlashPure Select, C18 30 μm spherical, 20 g

Débit : 60 mL/min

Phase : Inverse

Solvants : Méthanol et eau

Détecteur : UV-Visible à 198 à 810 nm, seuil 60 mAU

Logiciel : Spektra Software Package



8. Lecteur de microplaques par fluorescence

Fabricant : Agilent Technologies

Modèle : CYT5M

Excitation : 550/10

Émission : 590/10

Température : 37 °C, agité

Logiciel : Biotek Gen5 version 3.14



9. Réacteur haute pression et haute température (Parr)

Fabricant : Parr Instrument Company

Modèle : 4532

Volume : 2 L

Température maximale : 300 °C

Pression maximale d'utilisation : 1900 psi

Matériau : Acier inoxydable grade 316

Agitation : Mécanique à entraînement



10. Banc de filtration

Fabricant : BXA Innovation

Modèle : PLF200

Diamètre : 70 mm

Matériau : Acier inoxydable

Pression d'utilisation : 0 à 120 psi



11. Réacteur Process 30 L

Fabricant : Chemglass

Capacité : 30 L

Contrôle de température : double canal

Chauffage : Mantes chauffantes (1500 W + 2250 W)

Agitation : électrique à doubles hélices en PTFE

Refroidissement : Serpentin interne



12. Polarimètre

Fabricant : Jasco

Modèle : DIP-360

Longueur du trajet : 1 dm

Lampe : Sodium, SL-Na-1a

Solvant : Méthanol



13. Procédure expérimentale pour l'hydrolyse de l'acétate d'isobornyle (4) en isobornéol (6) et pour l'hydrolyse de l'acétate de bornyle (5) en bornéol (7) :

Préparer une solution de concentration 0,3 N d'hydroxyde de sodium (3 g ; 75 mmol) dans un mélange méthanol/dichlorométhane de rapport volumique 1:9 (25 mL MeOH: 225 mL CH₂Cl₂). Dans un flacon muni d'un agitateur magnétique, ajouter 5 g (25,5 mmol) de l'ester à hydrolyser et la solution basique. Agiter le mélange réactionnel à température ambiante pour une durée de 6 heures. Laver la phase organique avec une portion d'eau et ensuite sécher sur sulfate de sodium anhydre. Évaporer les solvants à l'évaporateur rotatif. Analyser le produit final par RMN ¹H afin de confirmer la conversion.

Isobornéol: solide blanc

RMN ¹H: 0,83 (s, 3H, CH₃), 0,91 (s, 3H, CH₃), 0,94-1,10 (m, 5H, 1H de CH₂(B), 1H de CH₂(C) et CH₃), 1,44-1,55 (m, 1H, CH₂(C)), 1,59 (s, 1H, OH), 1,62-1,81 (m, 4H, CH₂(A), CH et 1H de CH₂(B)), 3,63 (t, J=5,4 Hz, 1H, CH-O).

Les données spectrales correspondent avec celles disponibles dans la littérature. ⁹⁷

Bornéol: solide blanc

RMN ¹H: 0,86 (s, 3H, CH₃), 0,87 (s, 3H, CH₃), 0,88 (s, 3H, CH₃), 0,95 (dd, J=13,3 Hz, J= 3,5 Hz, 1H, CH₂(A)), 1,19-1,32 (m, 2H, 1H du CH₂(C) et 1H du CH₂(B)), 1,38 (s, 1H, OH), 1,56-1,67 (m, 1H, CH), 1,67-1,82 (m, 1H, CH₂(B)), 1,83-1,97 (m, 1H, CH₂(C)), 2,23-2,35 (m, 1H, CH₂(A)), 4,02 (dm, J=9,7 Hz, 1H, CH-O).

Les données spectrales correspondent avec celles disponibles dans la littérature. ⁹⁸

14. Procédure d'estérification de l'isobornéol (6) et du bornéol (7) en acétate d'isobornyle (4) et acétate de bornyle (5) respectivement :

Ajouter l'alcool à estérifier (0,5 g ; 3,24 mmol) dans un flacon muni d'un agitateur magnétique. Ajouter dix équivalents molaires d'acide acétique (1,95 g ; 32,4 mmol) et dix gouttes d'acide chlorhydrique concentré comme catalyseur. Agiter le mélange à 120 °C pendant 6 heures et suivre par RMN ¹H à chaque heure. Une fois la complétion atteinte, ajouter 2 mL d'heptane pour ensuite laver le mélange réactionnel avec deux portions d'eau. Sécher la phase organique avec du sulfate de sodium anhydre, filtrer et finalement évaporer les solvants à l'évaporateur rotatif. Analyser le produit final par RMN ¹H et par GC-FID pour confirmer l'identité et obtenir de l'information sur les temps de rétention des énantiomères de l'acétate de bornyle (5).

Acétate de bornyle : 85 %, solide blanc

RMN ¹H: 0,84 (s, 3H, CH₃), 0,88 (s, 3H, CH₃), 0,91 (s, 3H, CH₃), 0,97 (dd, J=13,8 Hz, J=3,51 Hz, 1H, CH₂(C)), 1,17-1,38 (m, 2H, 1H du CH₂(A) et 1H du CH₂(B)), 1,64-1,81 (m, 2H, CH et 1H du CH₂(B)), 1,88-2,00 (m, 1H, CH₂(A)), 2,08 (s, 3H, OCO-CH₃), 2,30-2,42 (m, 1H, CH₂(C)), 4,88 (dm, J=10,0 Hz, 1H, CH-OCO).

Les données spectrales correspondent avec celles disponibles dans la littérature.⁹⁹

15. Désodorisation de la térébenthine fournie par Westrock :

Pour chaque litre de térébenthine à désodoriser, un volume de 0,7 L d'hypochlorite de sodium 12 % est ajouté lentement sous agitation en s'assurant que la température demeure sous les 40 °C. Lorsque la température cesse d'augmenter avec l'ajout d'hypochlorite de sodium, le mélange est laissé sous agitation pour une heure supplémentaire afin d'achever la réaction. L'agitation est ensuite coupée et les phases sont décantées. La phase aqueuse (au-dessous) peut être éliminée et une masse d'environ 0,4 kg de sulfate de sodium anhydre est ajoutée pour sécher la phase organique. Après séchage, le mélange est filtré sur un filtre de porosité nominale 25 µm. La térébenthine en résultant peut être analysée par RMN ¹H afin de s'assurer que la composition n'a pas été modifiée.

16. Procédure de synthèse des nanotubes d'oxyde de titane :

Pour la confection du catalyseur, 10 g d'oxyde de titane anatase en nanopoudre (< 25 nm) ont été dispersés dans 400 mL d'une solution NaOH de concentration 10 mol/L. Cette suspension a été ajoutée dans le réacteur et agitée pendant environ 30 minutes. Toujours sous agitation, la température a été augmentée jusqu'à 150 °C et lorsque celle-ci a été atteinte, l'agitation a été éteinte. La température a été maintenue pour 24 heures puis la solution a été refroidie à 20 °C avant d'ouvrir le réacteur. La filtration a été réalisée sur Büchner avec un papier filtre en cellulose de porosité nominale 25 µm. Le solide a été lavé avec un litre d'eau distillée puis avec 500 mL d'une solution HCl 0,1 mol/L selon les directives de la référence littéraire. Le solide a finalement été séché au four à 50 °C sous vide pendant 60 heures. La poudre en résultant exhibait une teinte verdâtre. Optimisation : Augmenter la concentration en HCl de la solution de lavage à 0,5 mol/L.

17. Procédure d'activation de la clinoptilolite :

Une masse de 25 g de solide a été ajoutée à une solution d'acide sulfurique 18 mol/L sous agitation magnétique. Le contenu a été chauffé à 80 °C pour une durée de quatre heures pour ensuite être refroidi sous 50 °C. Le solide a été filtré sur un filtre en cellulose de porosité 25 µm pour ensuite être lavé avec de l'eau distillée jusqu'à pH neutre. Il a finalement été séché sous vide à 55 °C durant une période de 24 heures.

18. Procédure d'isomérisation en lot du α -pinène (1) ou de la térébenthine désodorisée en camphène (3) :

Dans un tricol approprié muni d'une mante chauffante et d'une agitation, ajouter le α -pinène (1) ou la térébenthine à isomériser. Agiter le contenu du tricol et ajouter 5 % massique des nanotubes d'oxyde de titane préparés et lavés (procédure 16 du présent annexe). Agiter à 140 °C pendant environ 3,5 heures en assurant un suivi réactionnel par RMN ¹H. La réaction est suivie par l'apparition du signal du camphène (3) à 4,51 ppm et valant pour un proton et par la disparition du signal caractéristique du α -pinène (1) à 5,2 ppm et équivalant aussi à un proton. Le rapport des intégrations du camphène (3) sur le total des intégrations multiplié par 100 chiffrera l'avancement de la réaction.

55 %, liquide visqueux clair ou jaunâtre

RMN ¹H: 1,04 (s, 3H, CH₃), 1,06 (s, 3H, CH₃), 1,18-1,30 (m, 2H, 1H du CH₂(A) et 1H du CH₂(B)), 1,31-1,49 (m, 1H, CH₂(C)), 1,60-1,77 (m, 3H, 1H du CH₂(A), 1H du CH₂(B) et 1H du CH₂(C)), 1,91 (d, J=2,54 Hz, 1H, CH), 2,69 (d, J=3,80 Hz, 1H, CH), 4,51 (s, 1H, C=CH₂), 4,73 (s, 1H, C=CH₂).

Les données spectrales correspondent avec celles disponibles dans la littérature. ¹⁰⁰

19. Procédure d'isomérisation en continu du α -pinène (1) ou de la térébenthine désodorisée en camphène (3) :

Dans un système de chimie en continu muni d'un contrôle de température et d'un refroidissement à la sortie de la tubulure, le α -pinène (1) et la térébenthine peuvent être isomérisés. Remplir les cartouches de nanotubes d'oxyde de titane préparés selon la procédure 16 de l'annexe A en s'assurant de les compacter suffisamment. Connecter le système et le préchauffer à 140 °C. Injecter le réactif choisi à travers le système à chaud. Le temps de résidence dans les cartouches doit s'élever à 60 minutes idéalement. Ce temps de contact est calculable par le volume (en mL) des cartouches multipliés par la porosité des nanotubes (88 %) divisé par le débit de la pompe (en mL/min). Le suivi est assuré par RMN ¹H selon la même méthode que pour l'isomérisation en lot.

20. Procédure d'estérification en lot du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) :

Dans un tricol approprié, ajouter le camphène (3) et deux équivalents molaires d'acide acétique glacial. Agiter le mélange afin de dissoudre le camphène (3) et ajouter le catalyseur Amberlyst 15 solide. Chauffer à 40 °C pendant 1 heure sous agitation. Abaisser ensuite la température à 20 °C et conserver sous agitation pour deux heures supplémentaires. La réaction est suivie par l'apparition du signal de l'acétate d'isobornyle (4) à 4,65 ppm et valant pour un proton et par la disparition du signal caractéristique du camphène (3) à 4,51 ppm et équivalant aussi à un proton. Le rapport des intégrations de l'acétate d'isobornyle (4) sur le total des intégrations multiplié par 100 chiffrera l'avancement de la réaction.

85%, liquide clair

RMN ¹H : 0,83 (s, 6H, CH3(A) et CH3(C)), 0,96 (s, 3H, CH3(B)), 1,00-1,20 (m, 2H, 1H du CH2(A) et 1H du CH2(B)), 1,46-1,60 (m, 1H, CH2(A)), 1,61-1,85 (m, 4H, CH2(C), CH et 1H du CH2(B)), 2,01 (s, 3H, OCO-CH3), 4,65 (dd, J= 7,2 Hz, J=3,3 Hz, 1H, CH-OCO).

Les données spectrales correspondent avec celles disponibles dans la littérature.¹⁰¹

21. Procédure d'estérification en continu du camphène (3) en acétate d'isobornyle (4) :

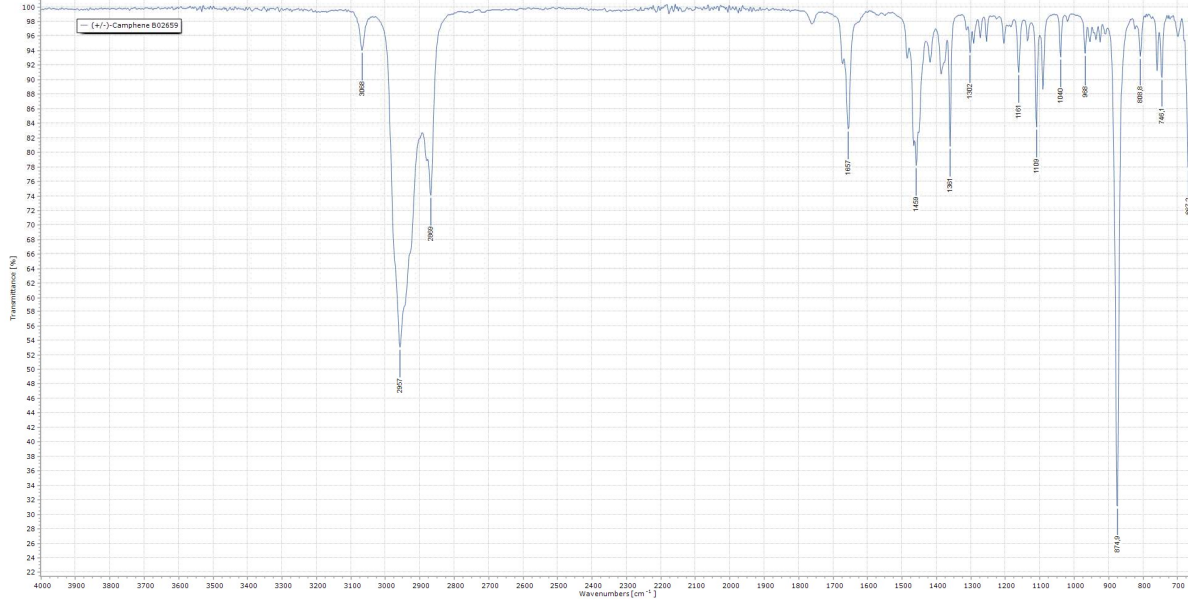
Dans un système de chimie en continu muni d'un contrôle de température et d'un refroidissement entre les deux colonnes, remplir les cartouches de catalyseur solide Amberlyst 15 en s'assurant de laisser un volume vide d'environ 10 % pour l'expansion des billes lors du contact avec le mélange réactionnel. Connecter le système et préchauffer la première cartouche à 40 °C. La deuxième cartouche doit demeurer tempérée à 20 °C. Dans un réservoir, mélanger le camphène (3) avec deux équivalents d'acide acétique glacial. Injecter le mélange réactionnel à travers le système comprenant les colonnes à 40 °C et 20 °C. Le temps de résidence dans les cartouches doit s'élever à 10 minutes au total. Ce temps de contact est calculable par le volume (en mL) des cartouches multipliés par la porosité des nanotubes (30 %) divisé par le débit de la pompe (en mL/min). Le suivi est assuré par RMN ¹H selon la même méthode que pour l'estérification en lot.

ANNEXE B

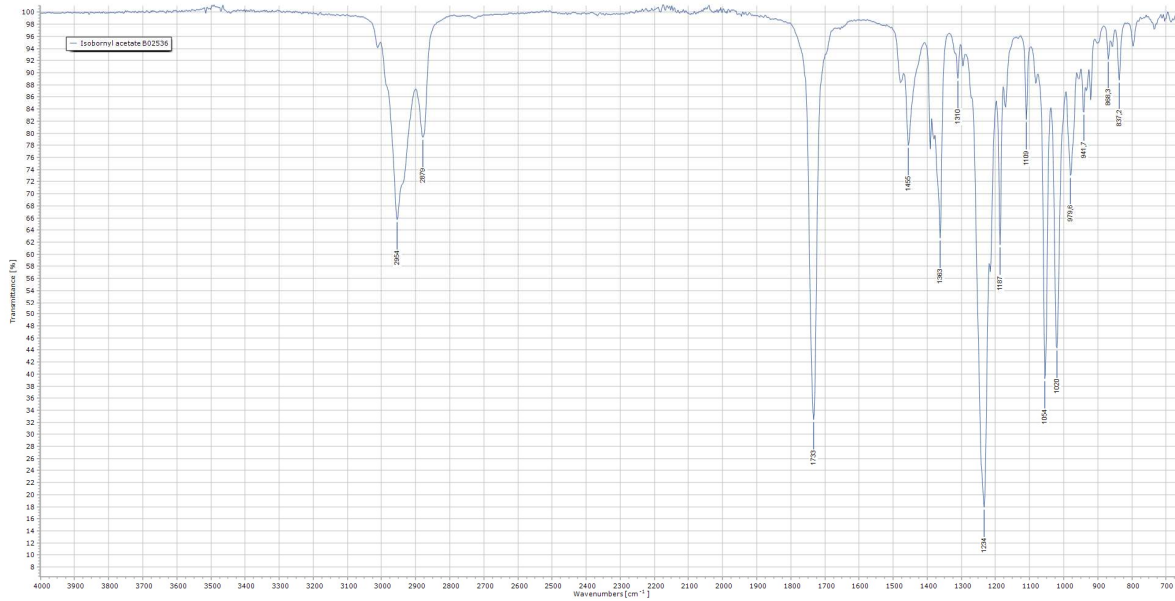
Spectres FTIR

Section 1.1 :

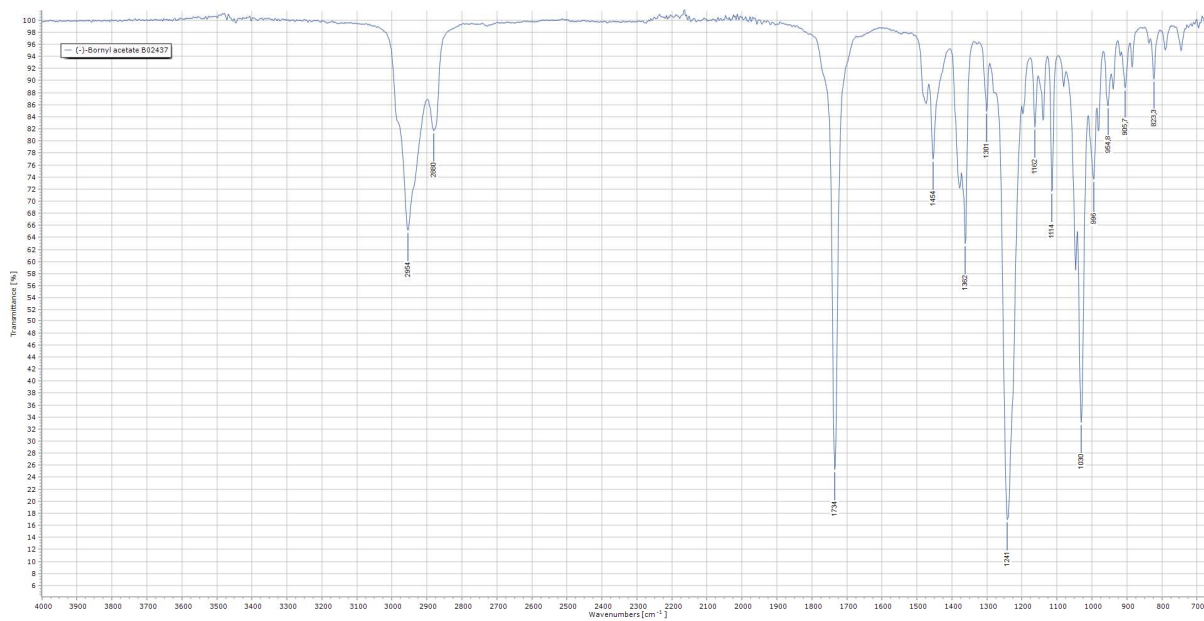
Camphène (3) :



Acétate d'isobornyle (4) :



Acétate de bornyle (5) :



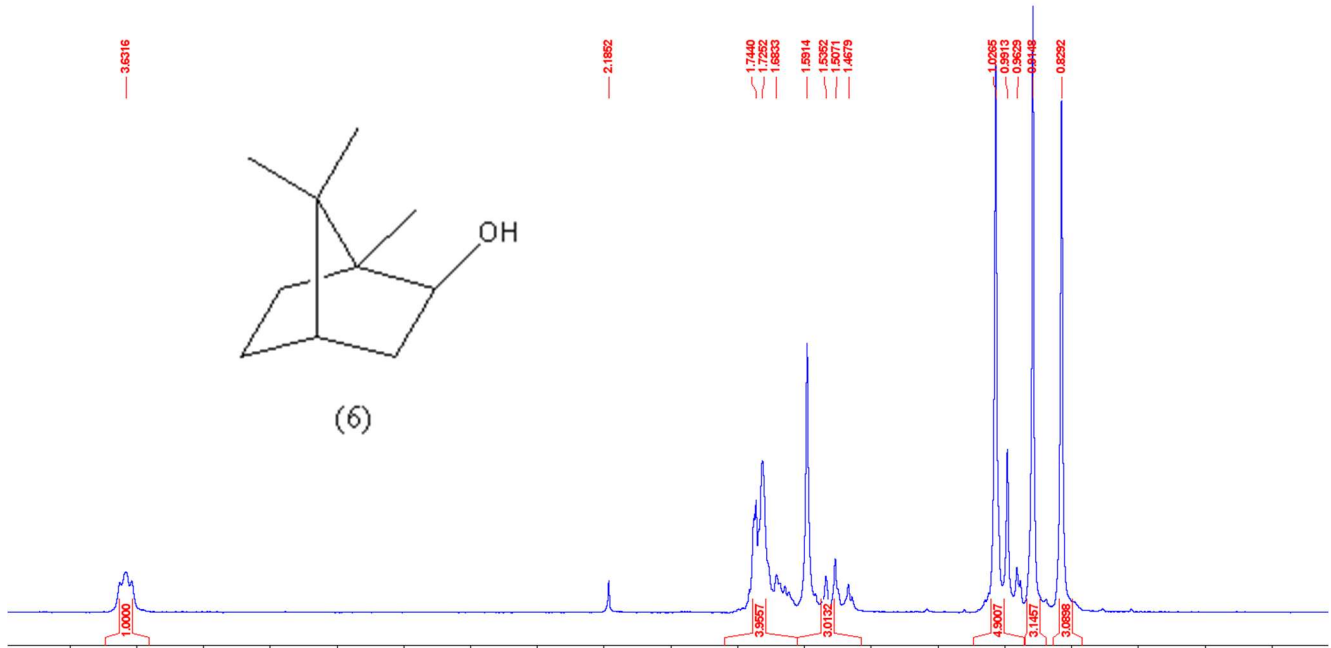
ANNEXE C

Spectres RMN

Section 1.1.4

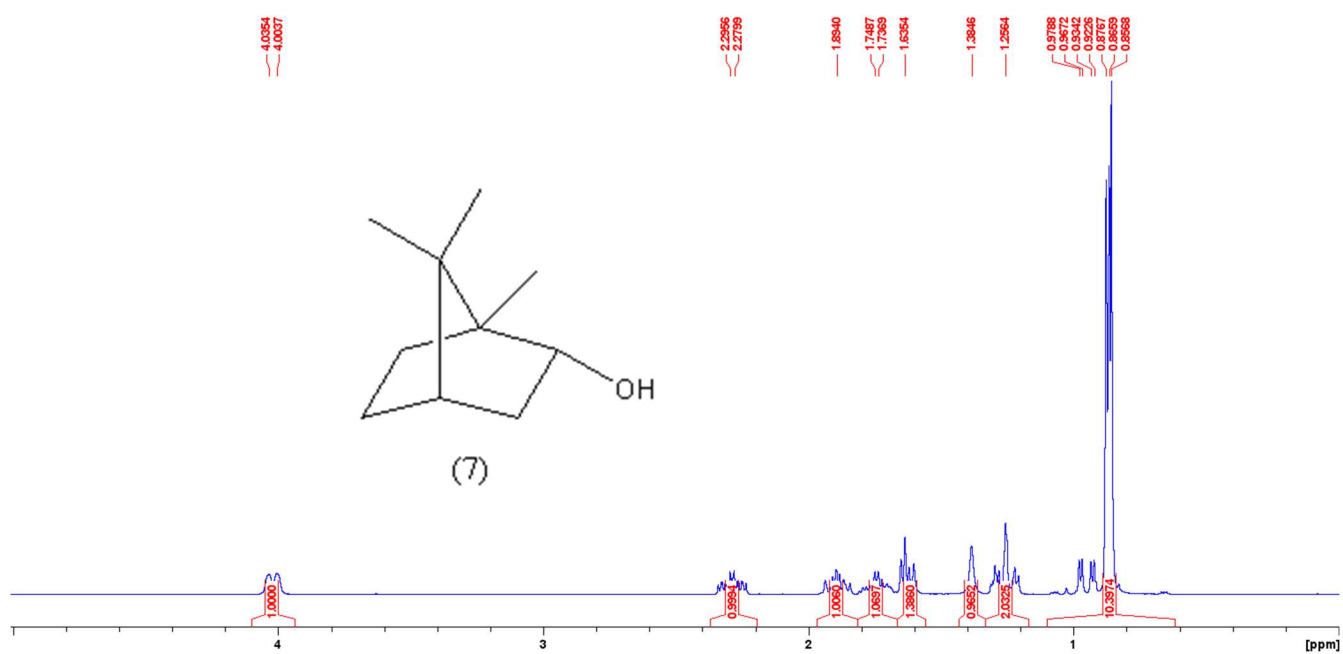
Spectre RMN ^1H de l'isobornéol (6) commercial :

"Isoborneol B03485" 1 1 "C:\Users\Desro\OneDrive\Master\Recherche\Analyses\RMN\1- Produits chimiques"



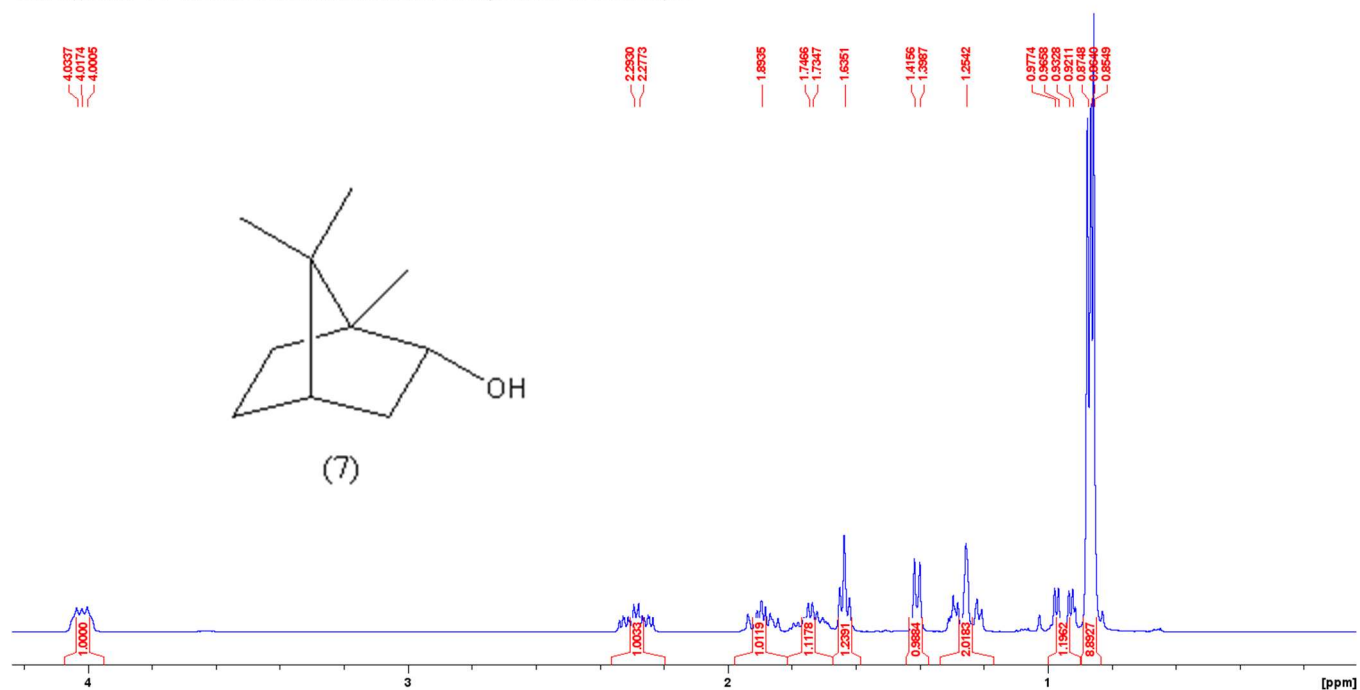
Spectre RMN ^1H du (+)-bornéol (7) commercial :

"Borneol (+) B03237" 1 1 "C:\Users\Desro\OneDrive\Master\Recherche\Analyses\RMN\1- Produits chimiques"



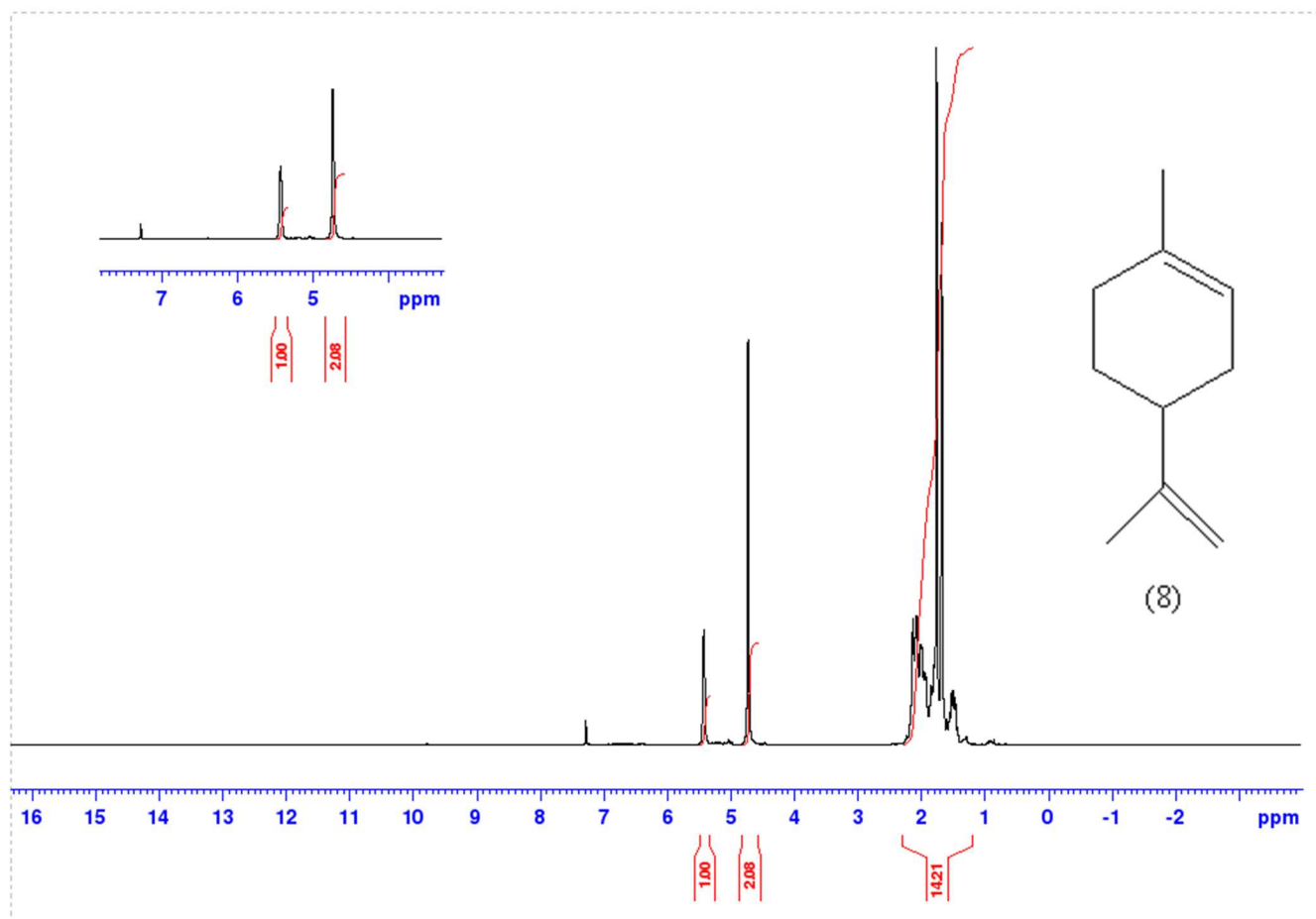
Spectre RMN ^1H du (-)-bornéol (7) commercial :

"Borneol (-) B03098" 1 1 "C:\Users\Desro\OneDrive\Master\Recherche\Analyses\RMN\1- Produits chimiques"



Section 1.2.1

Spectre RMN ^1H du limonène (8) commercial :

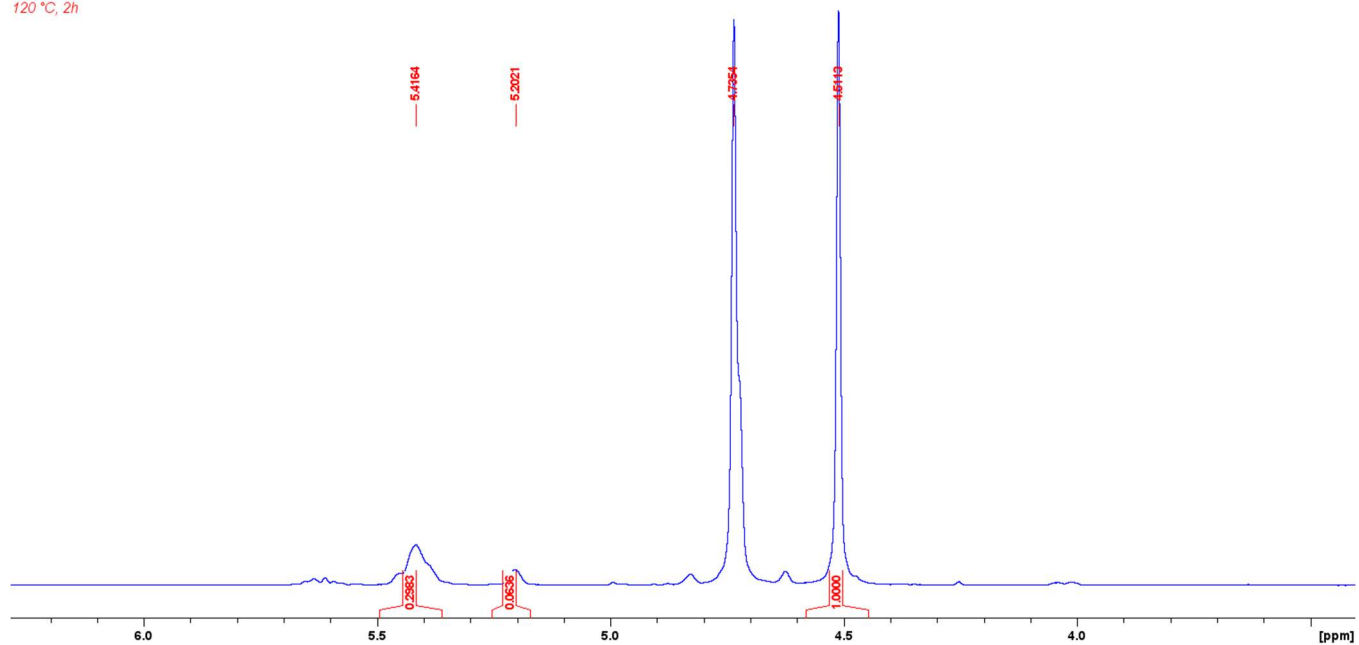


Section 2.1.1

Spectre RMN de la conversion du α -pinène (1) à 120 °C après 2 heures par les nanotubes lavés avec HCl 0,5 mol/L

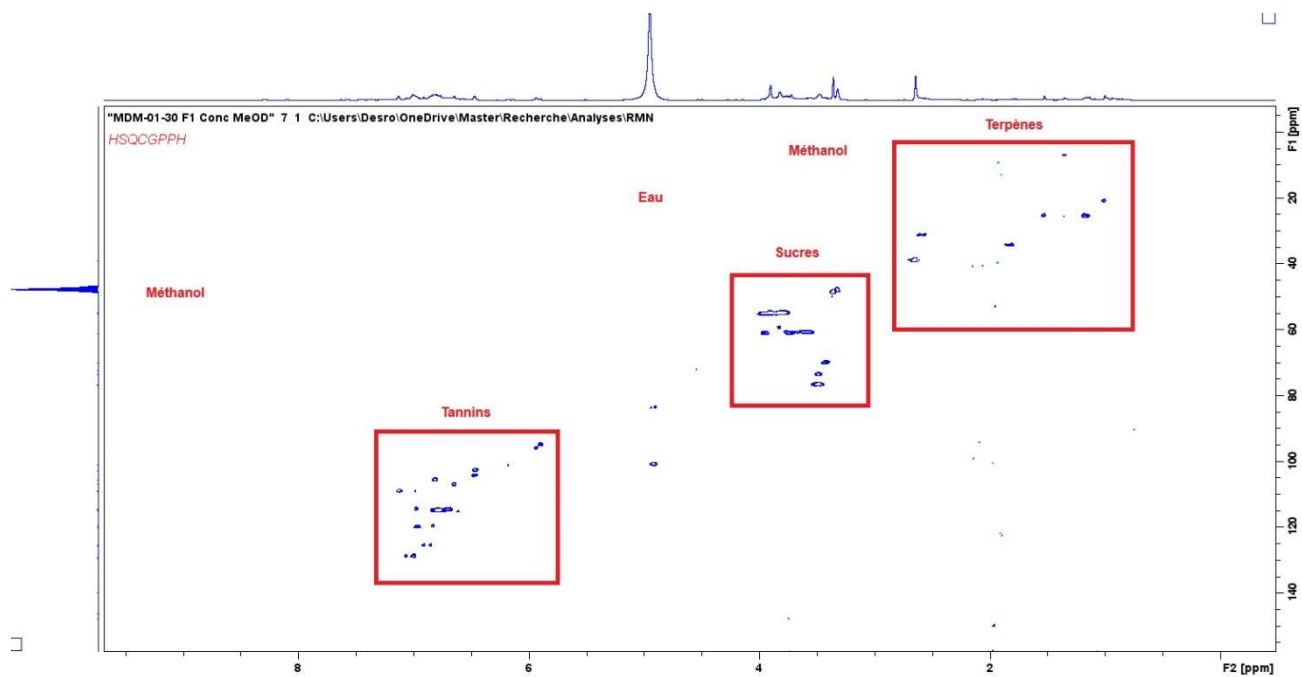
MDM-01-75-C 1 1 C:\Users\Desro\OneDrive\Master\Recherche\Analyses\RMN

Catalyse α -pinene to camphene
Nanotubes lavés HCl 0,5 M
120 °C, 2h

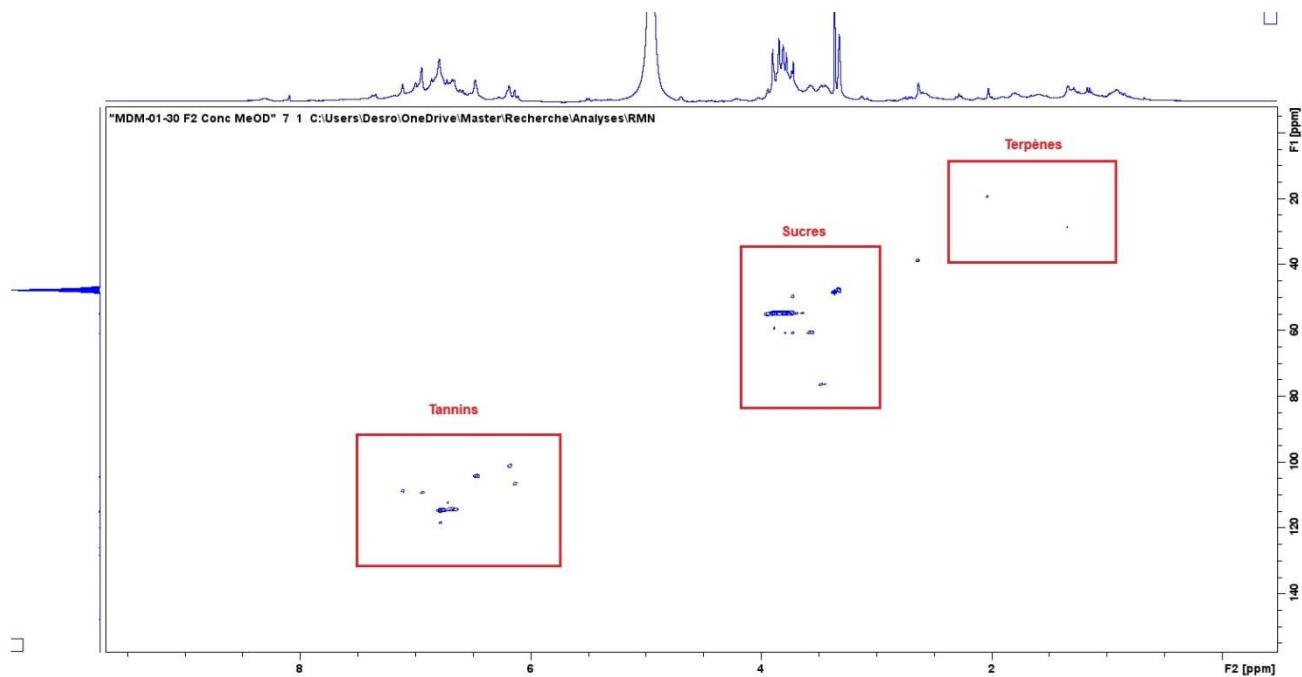


Section 3.1.2 : Spectre RMN HSQC des fractions F1 à F6

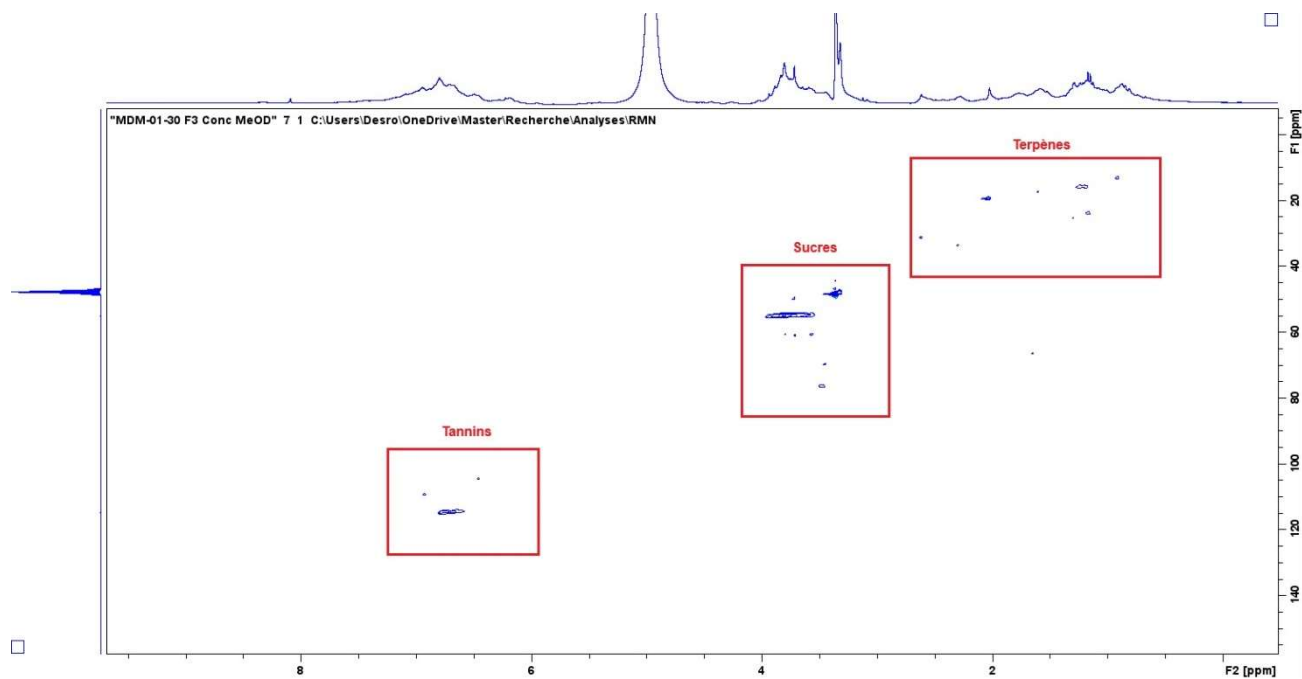
Fraction 1



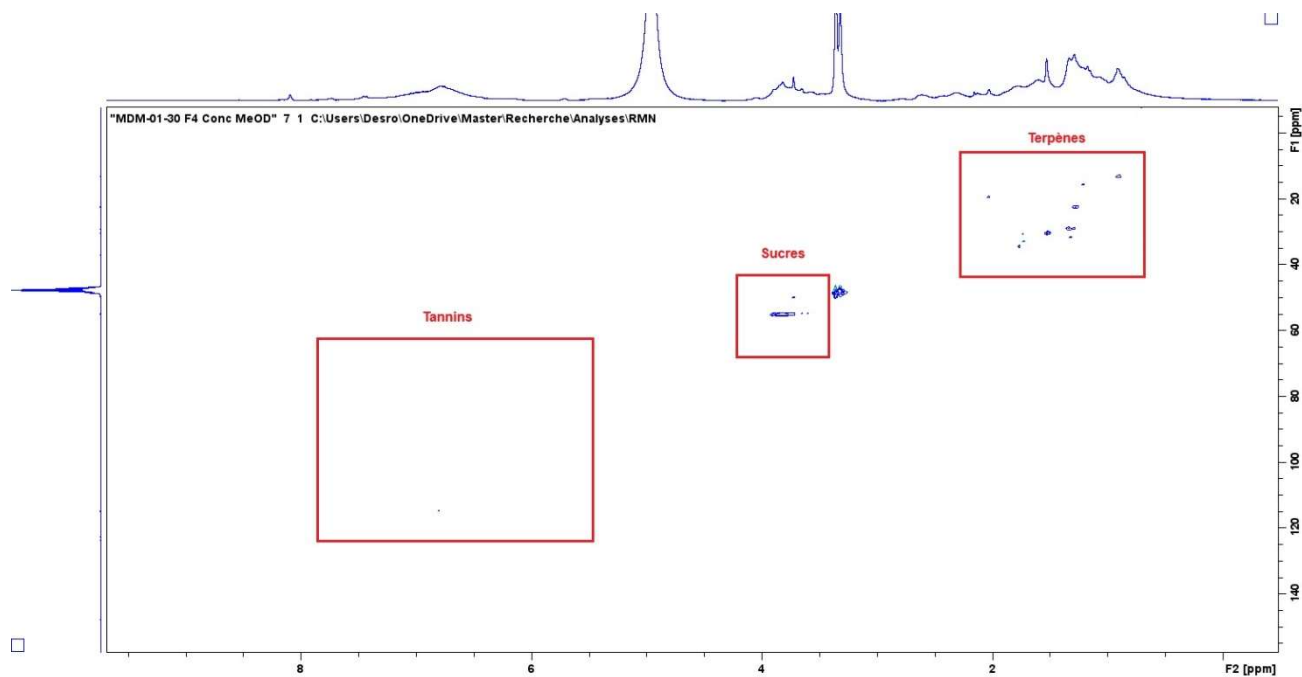
Fraction 2



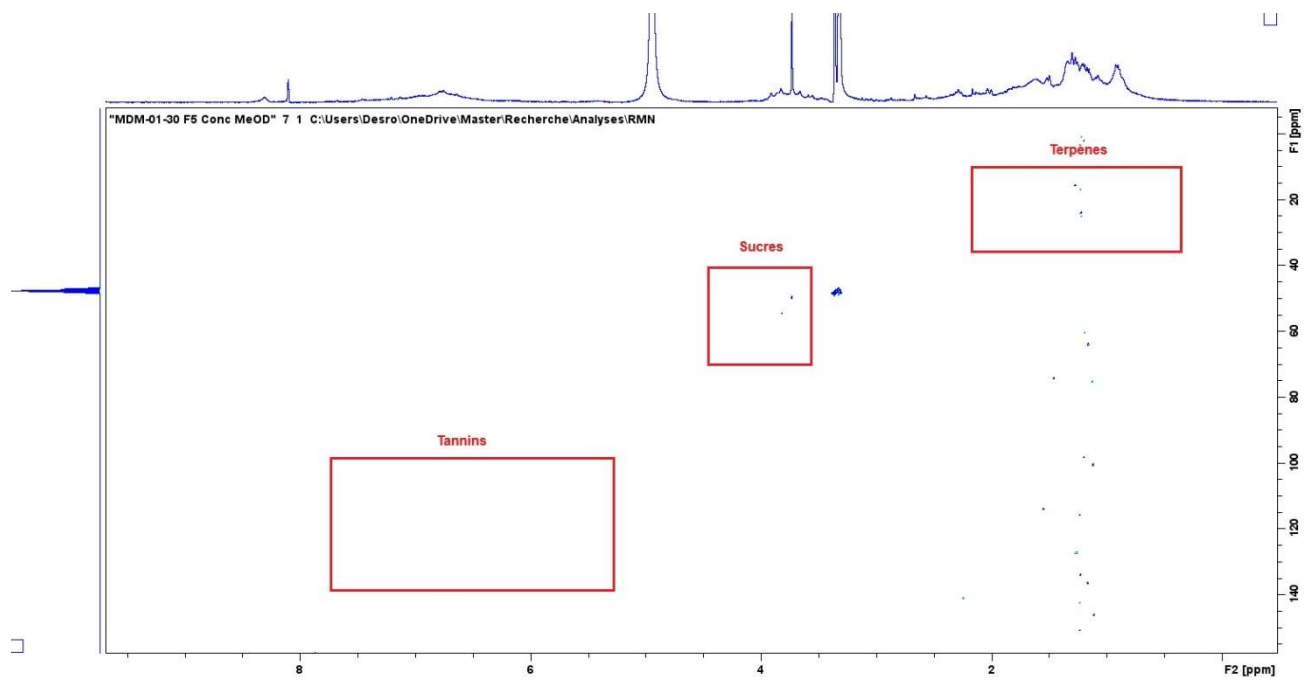
Fraction 3



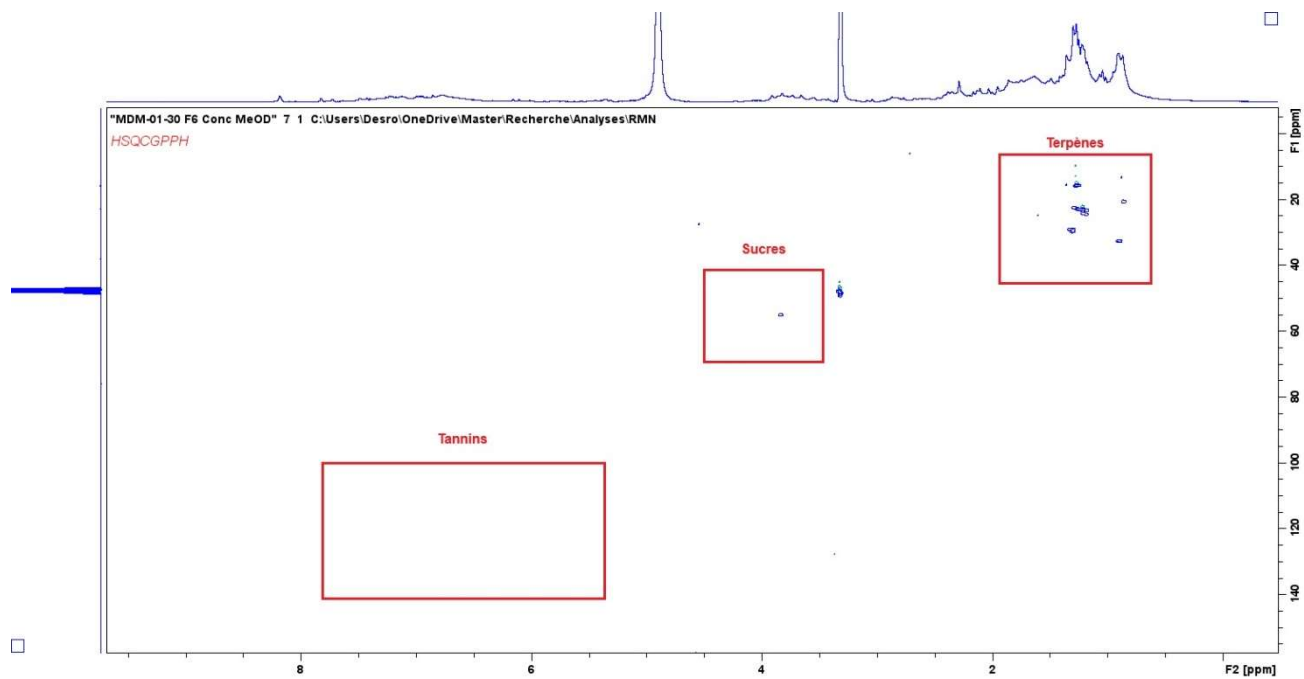
Fraction 4



Fraction 5



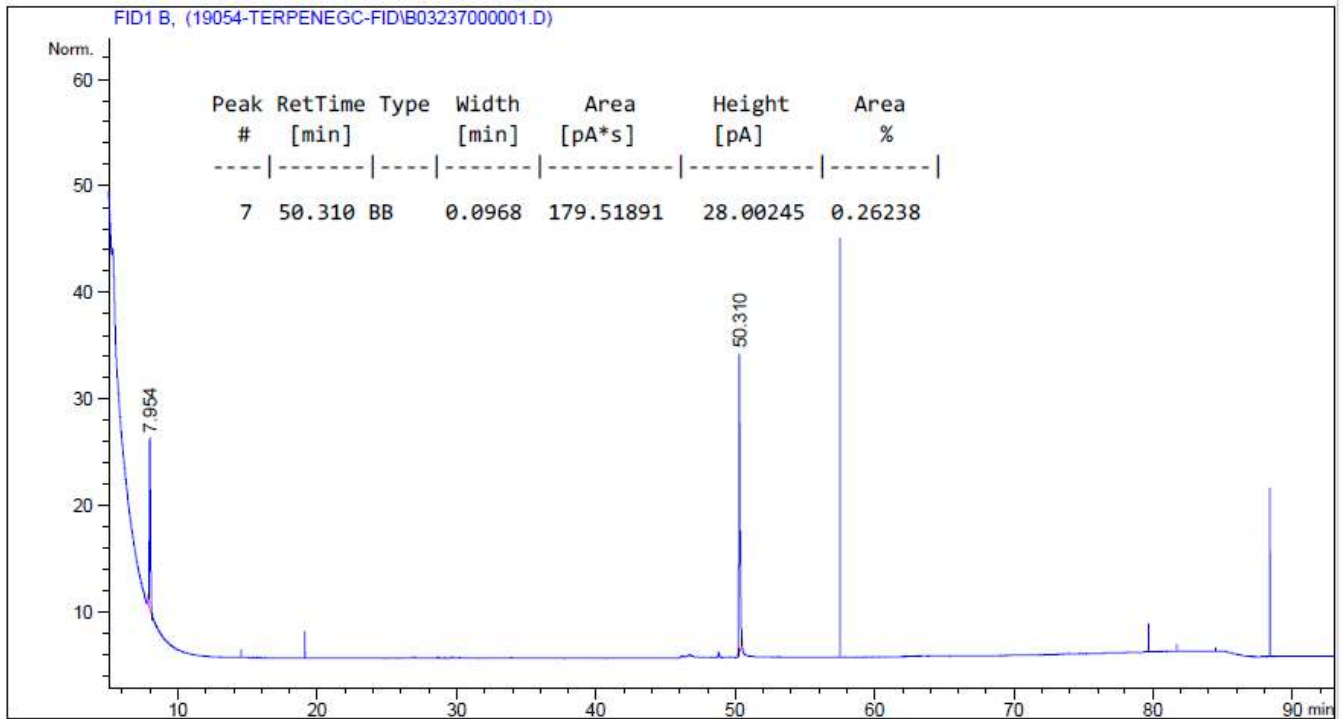
Fraction 6



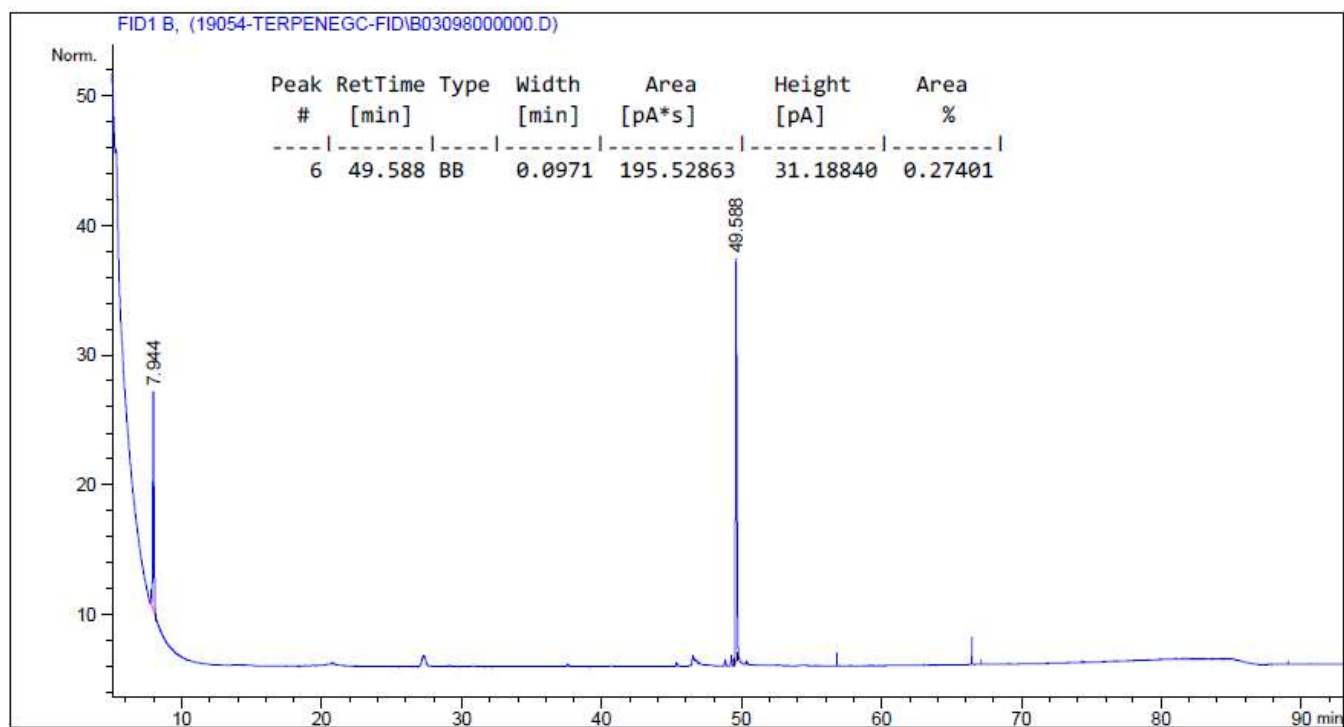
ANNEXE D
Chromatogrammes GC-FID

Section 1.1.4

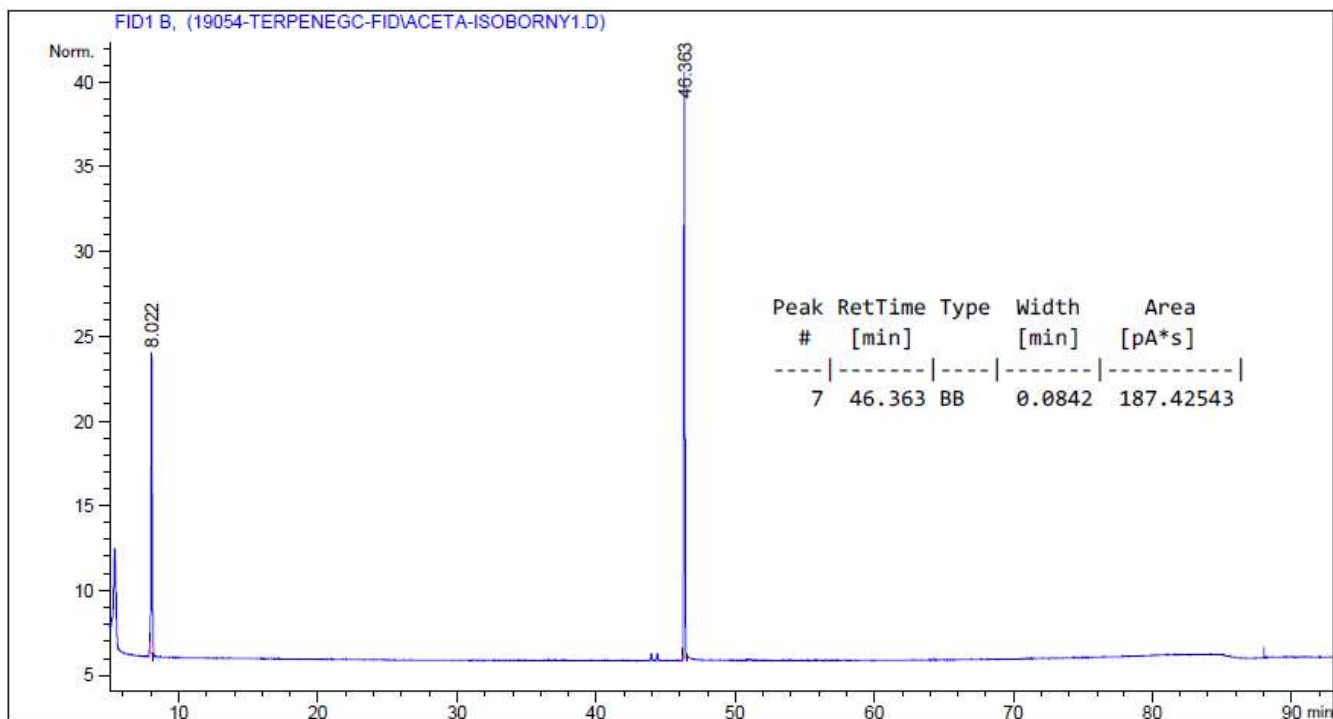
Chromatogramme GC-FID chiral du (+)-bornéol (7)



Chromatogramme GC-FID chiral du (-)-bornéol (7) :

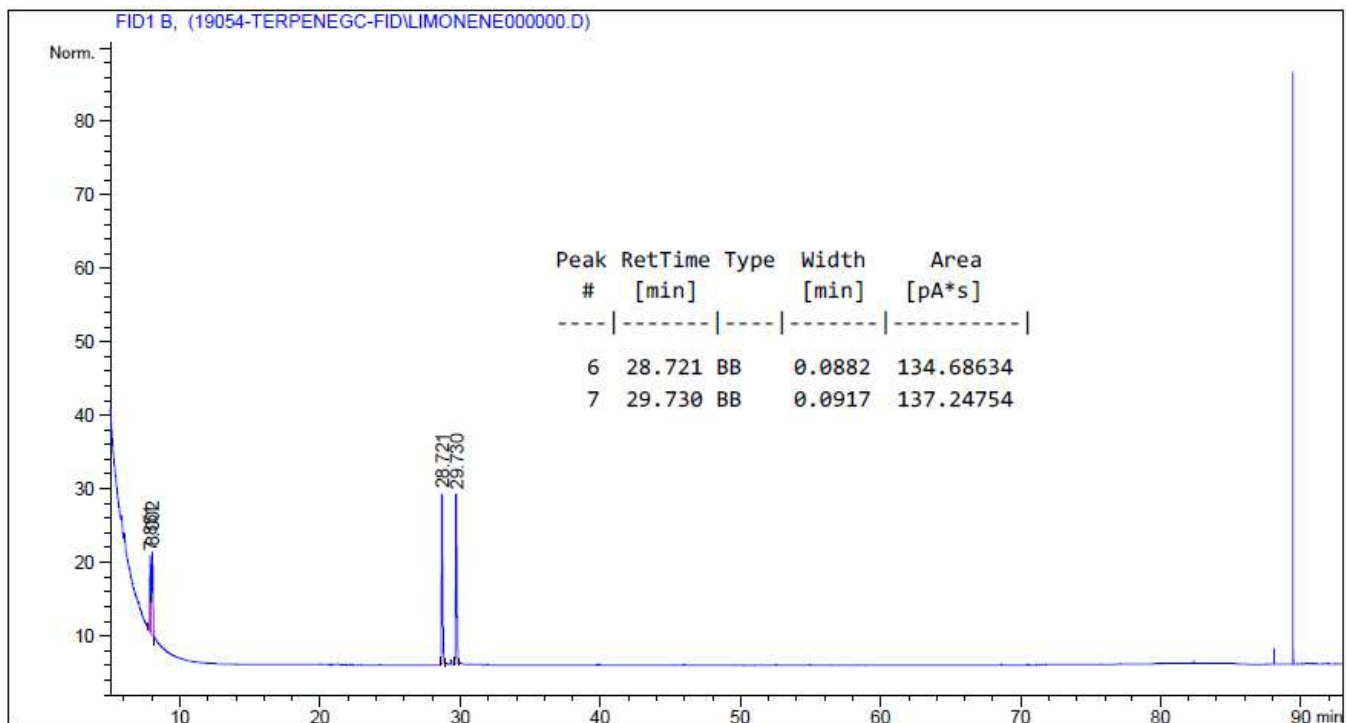


Chromatogramme GC-FID chiral de l'acétate d'isobornyle (4) racémique :

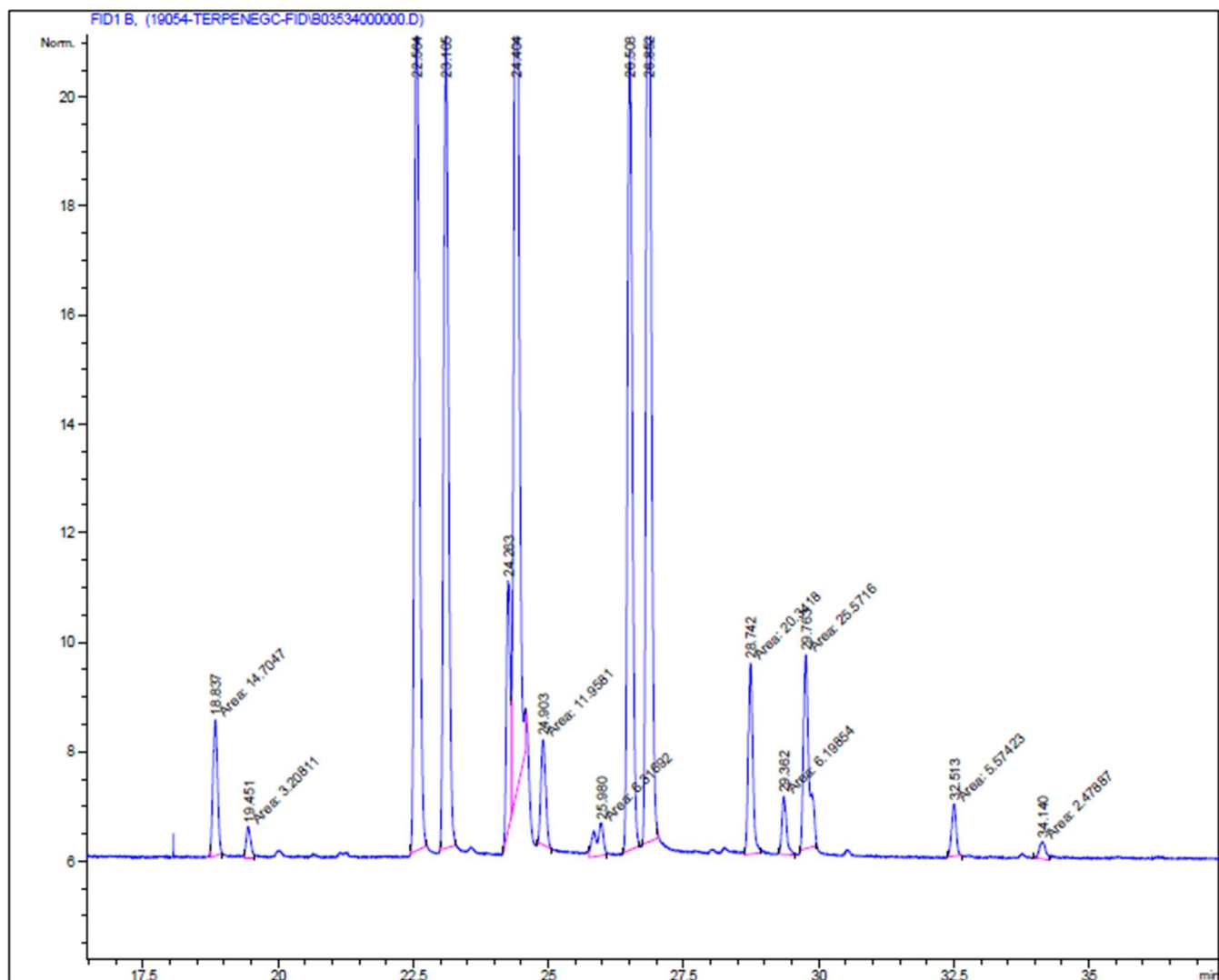


Section 1.2.1

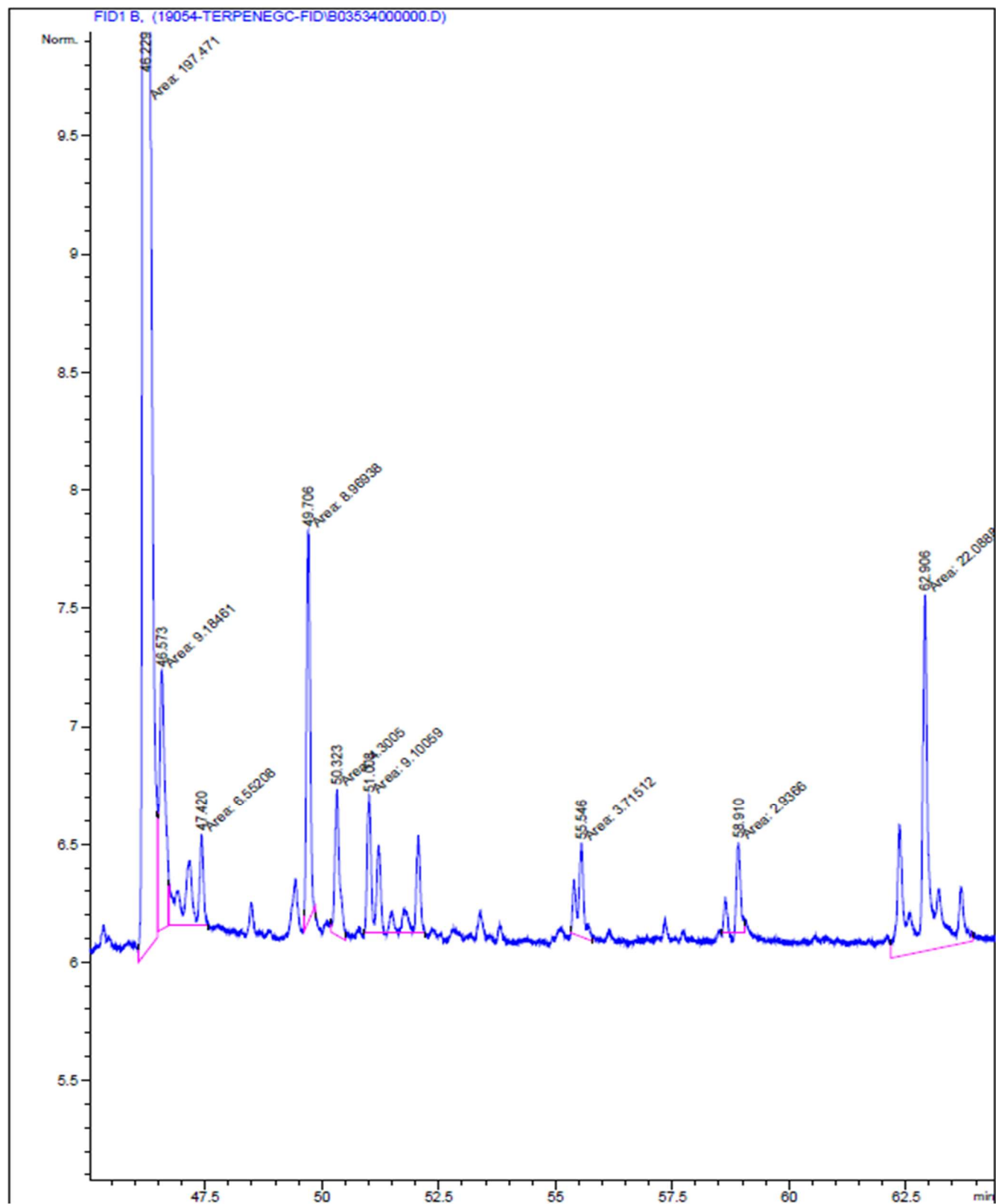
Chromatogramme GC-FID chiral du limonène (8) D/L :



Chromatogramme GC-FID chiral de l'huile essentielle d'épinette noire Boréa – Agrandissement 18 à 35 min :

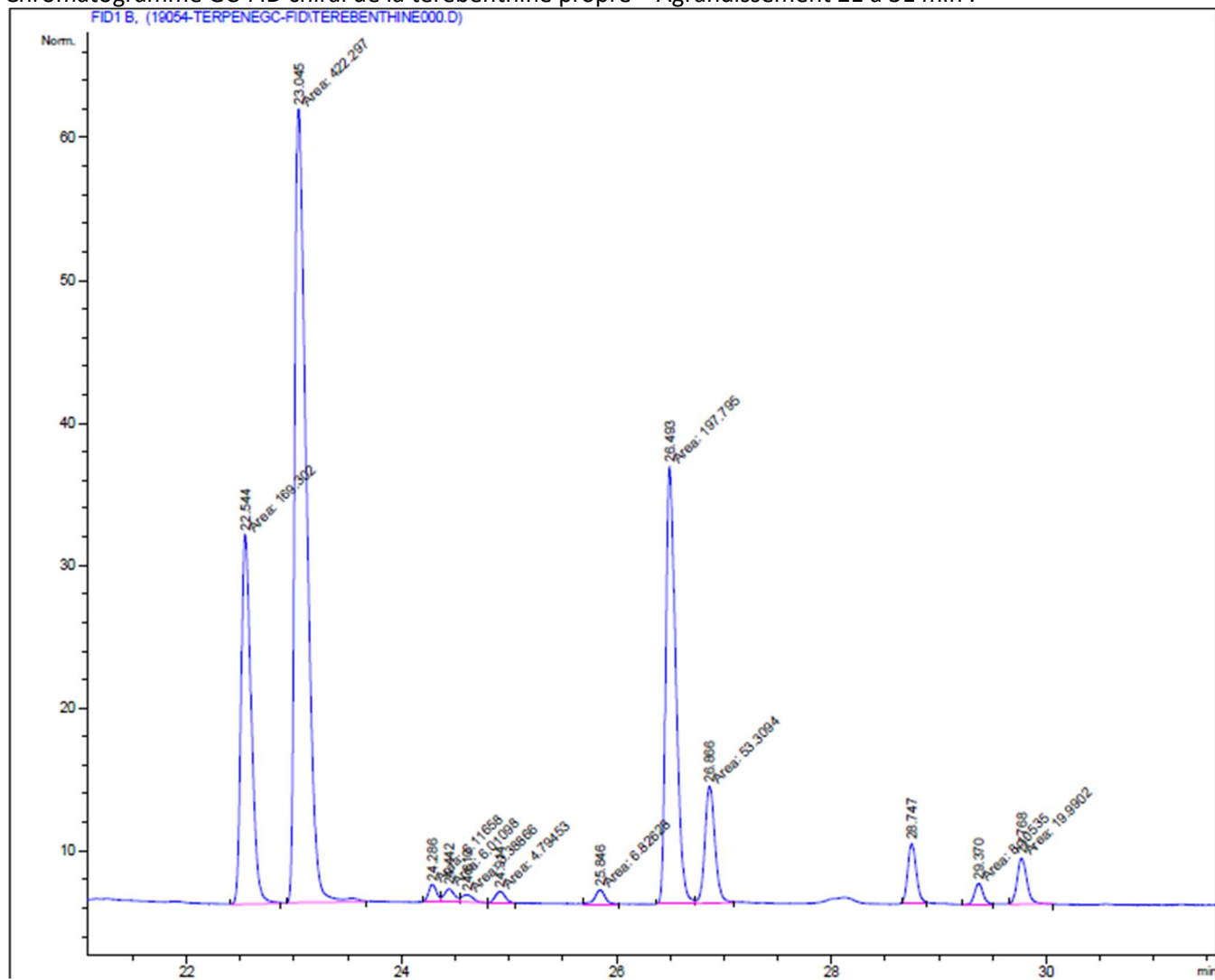


Chromatogramme GC-FID chiral de l'huile essentielle d'épinette noire Boréa – Agrandissement 45 à 63 min :



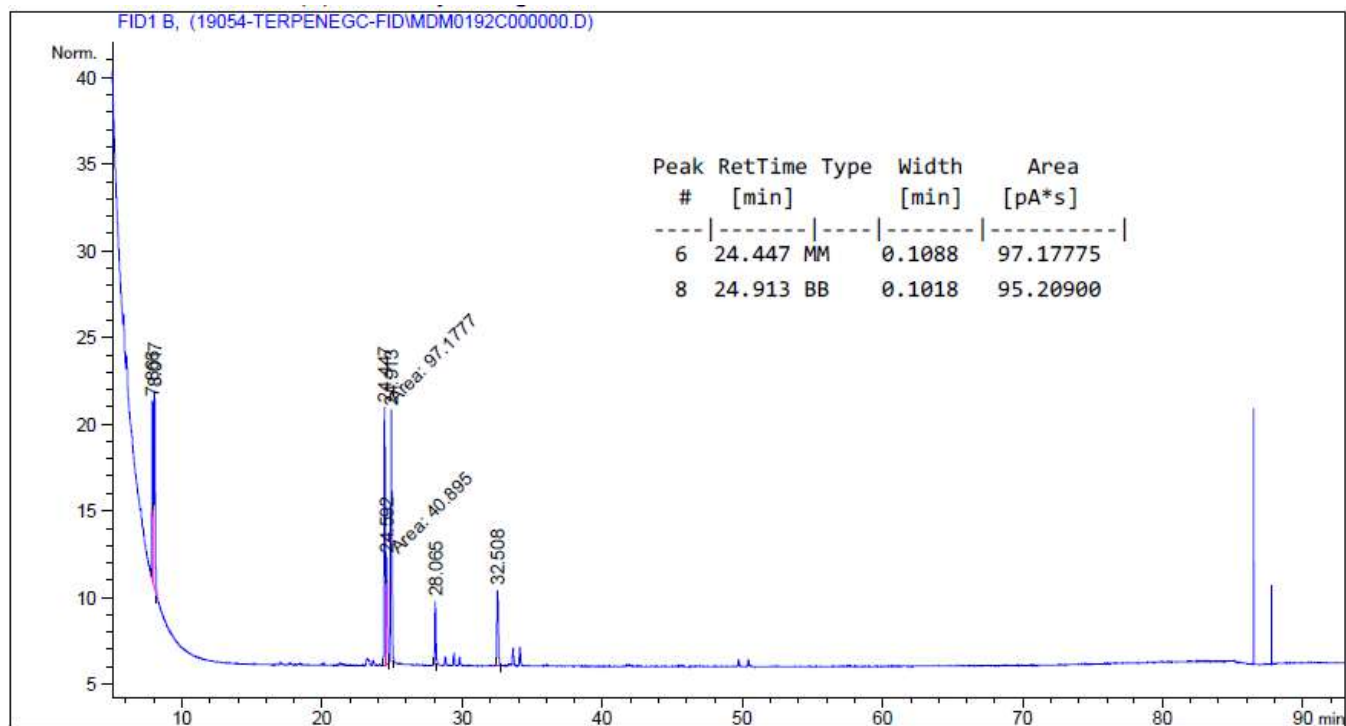
Section 1.2.2

Chromatogramme GC-FID chiral de la térébenthine propre – Agrandissement 21 à 31 min :



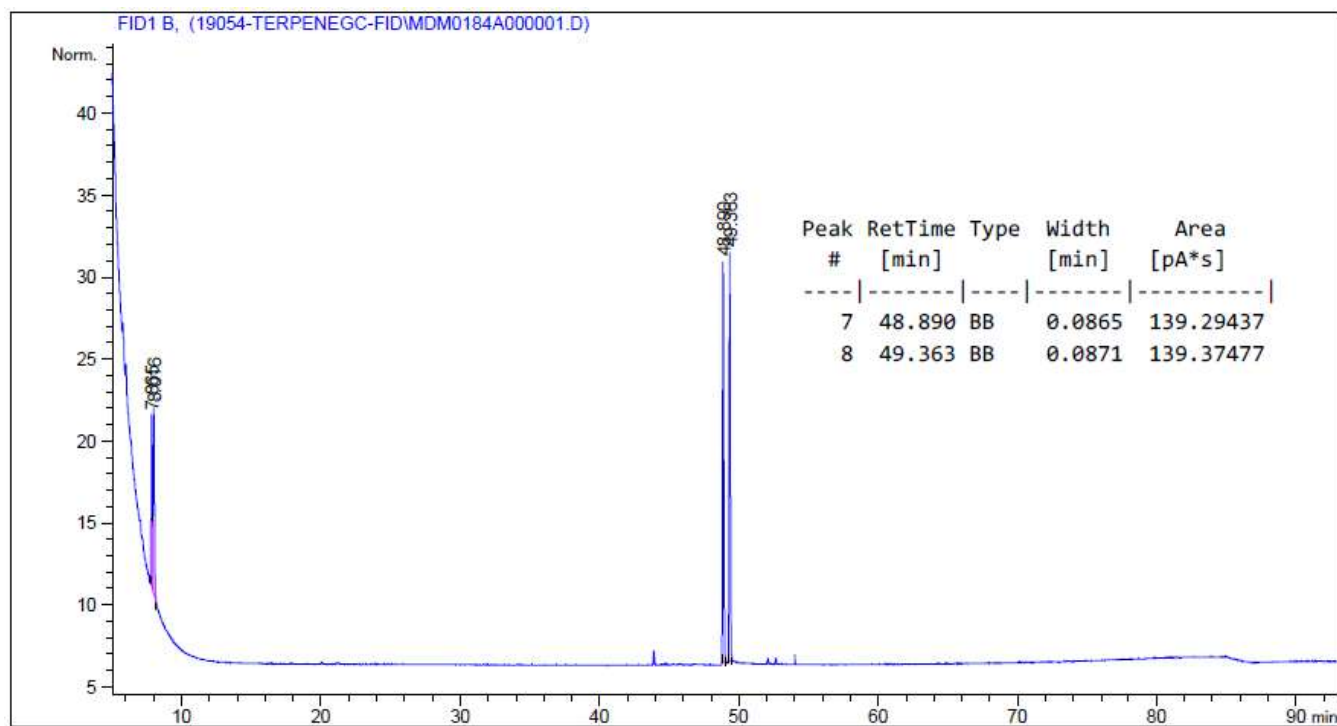
Section 2.3.1

Chromatogramme du produit d'isomérisation du α -pinène (1) racémique



Section 2.3.2

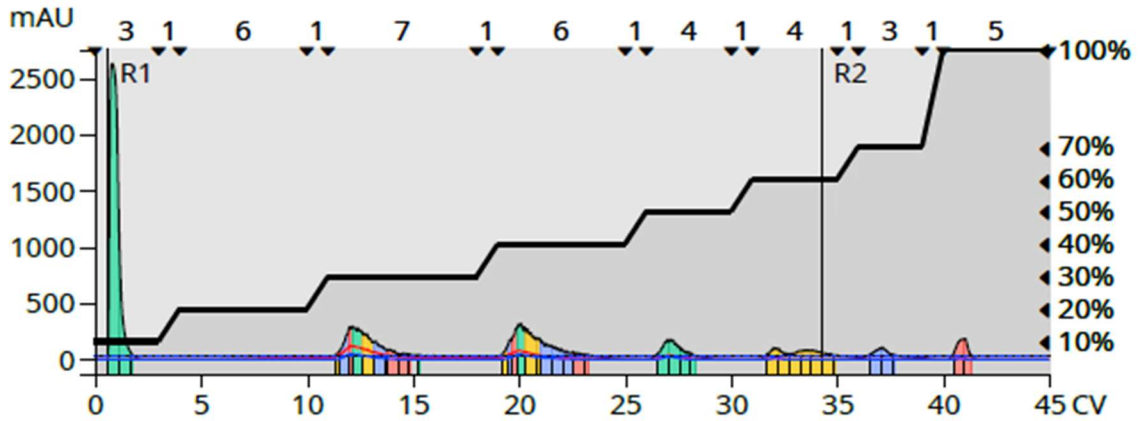
Chromatogramme du produit d'estérification du camphène (3) racémique, hydrolysé pour analyse



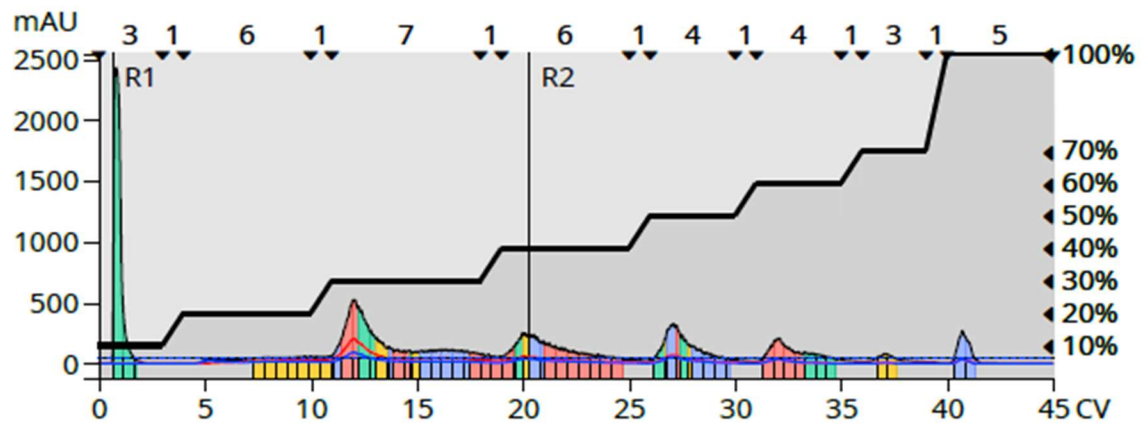
ANNEXE E

Rapports des séparations par Biotage

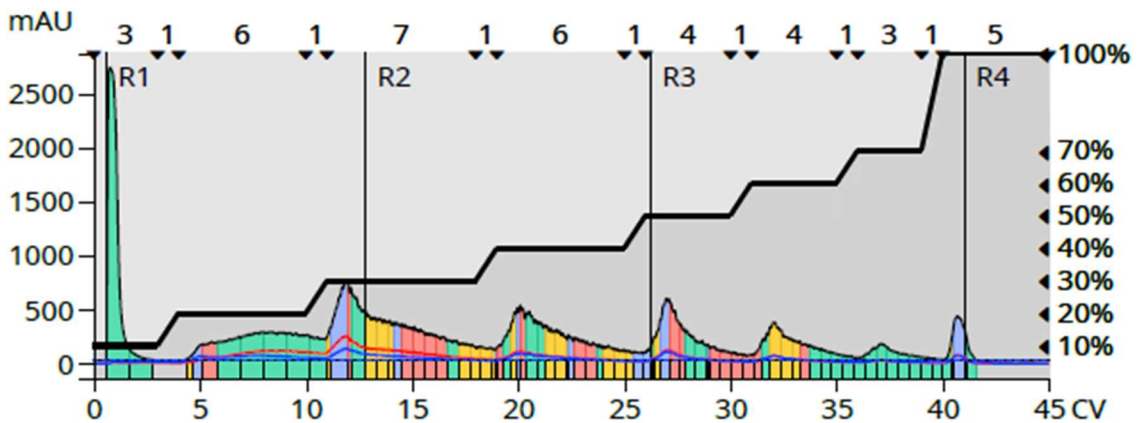
Séparation 1



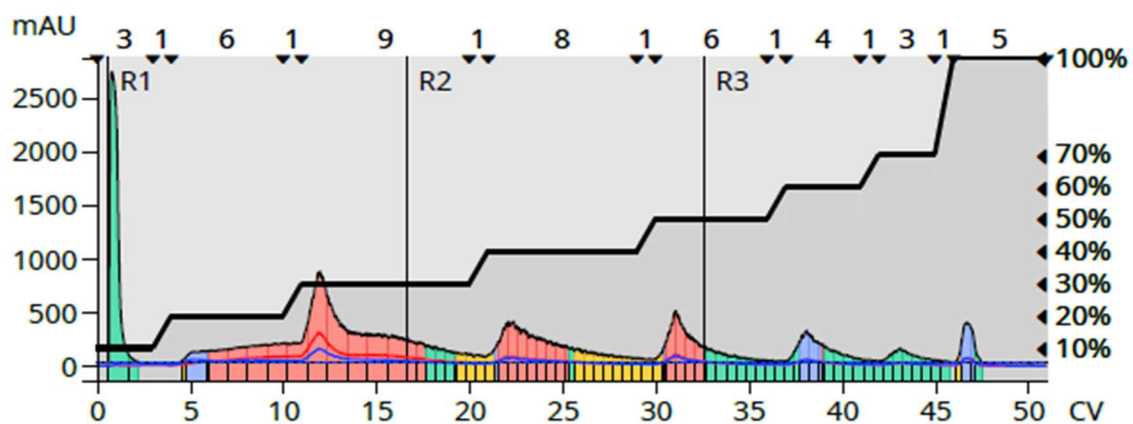
Séparation 2



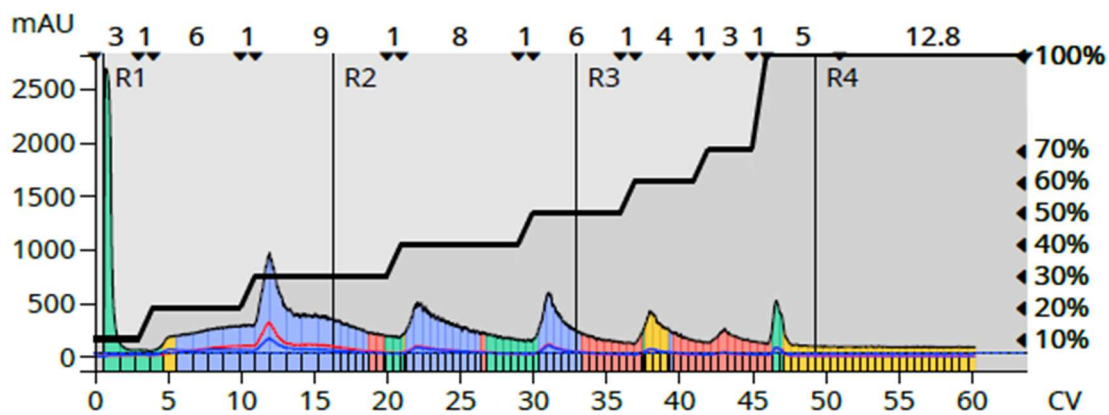
Séparation 3



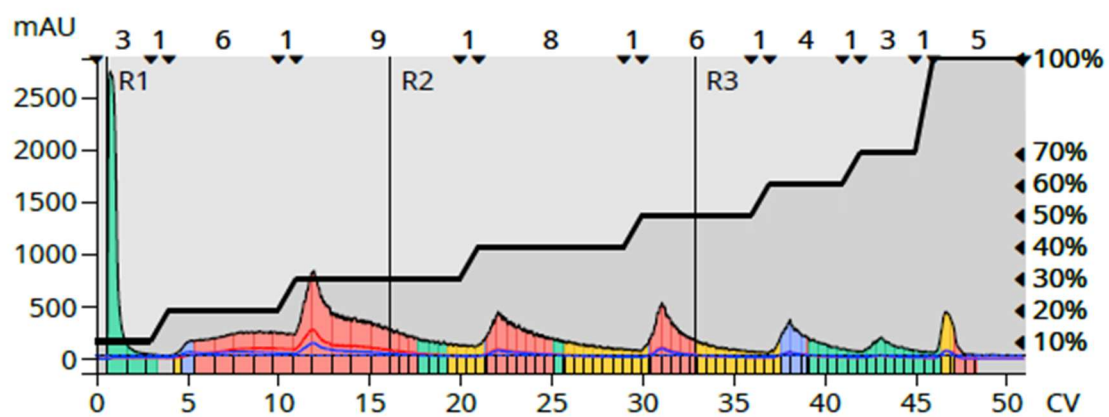
Séparation 4



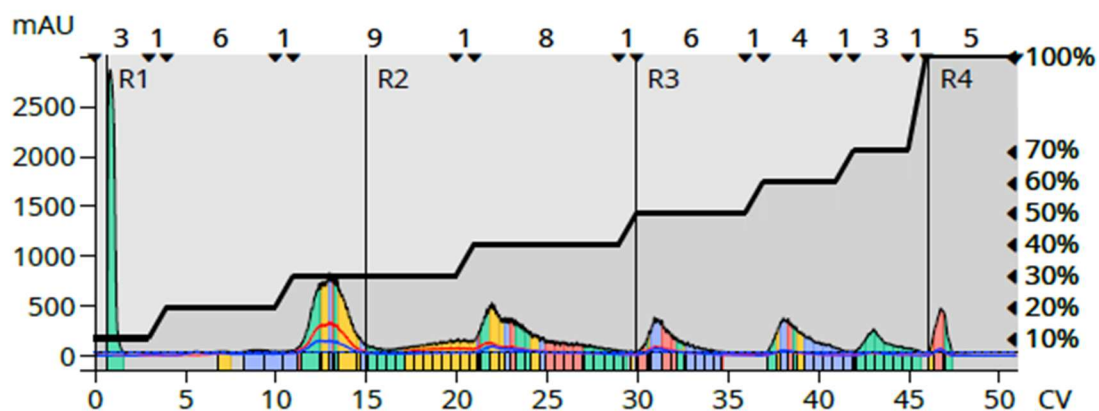
Séparation 5



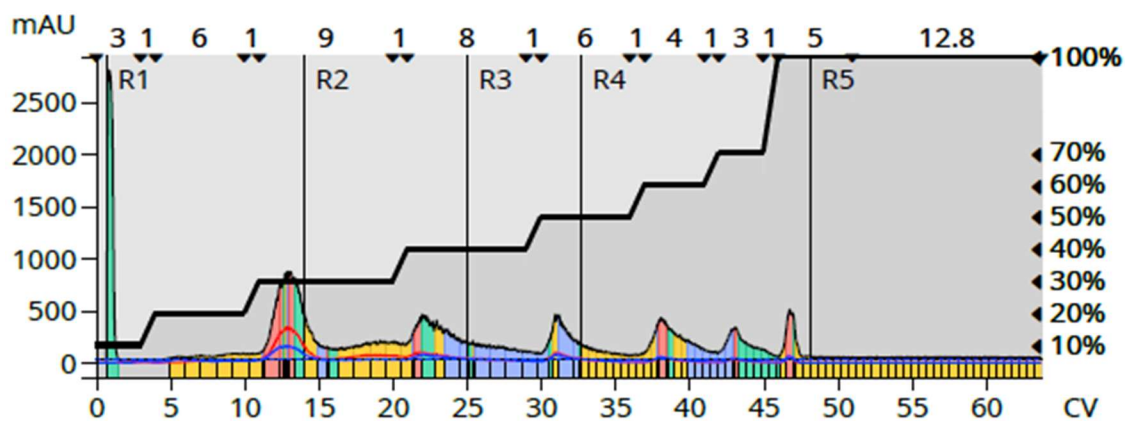
Séparation 6



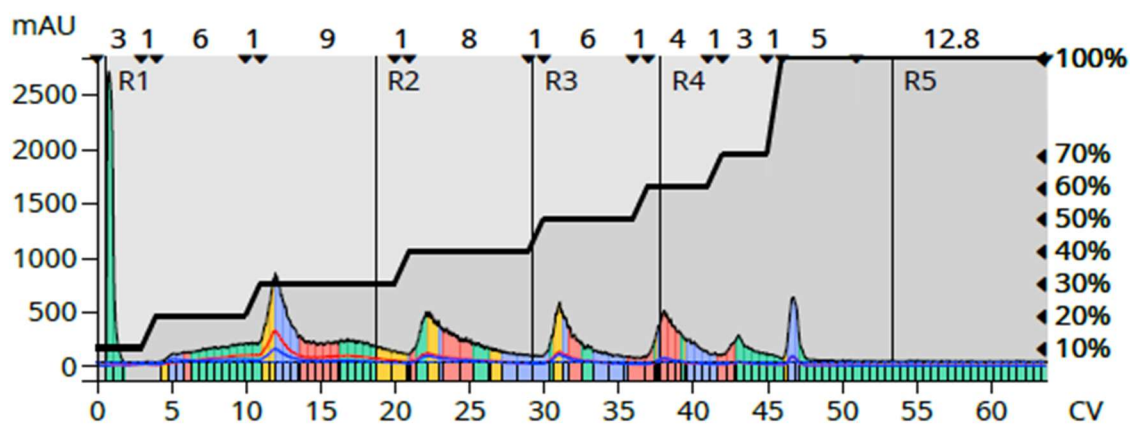
Séparation 7



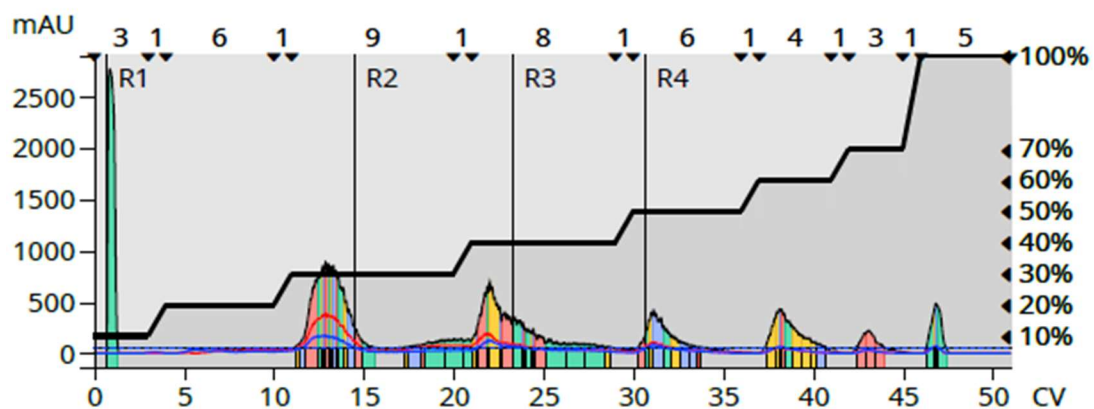
Séparation 8



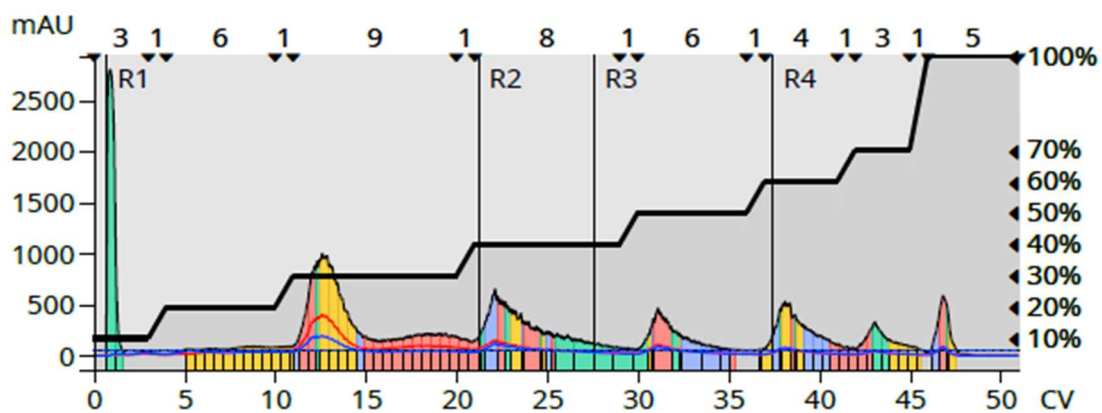
Séparation 9



Séparation 10



Séparation 11



ANNEXE F

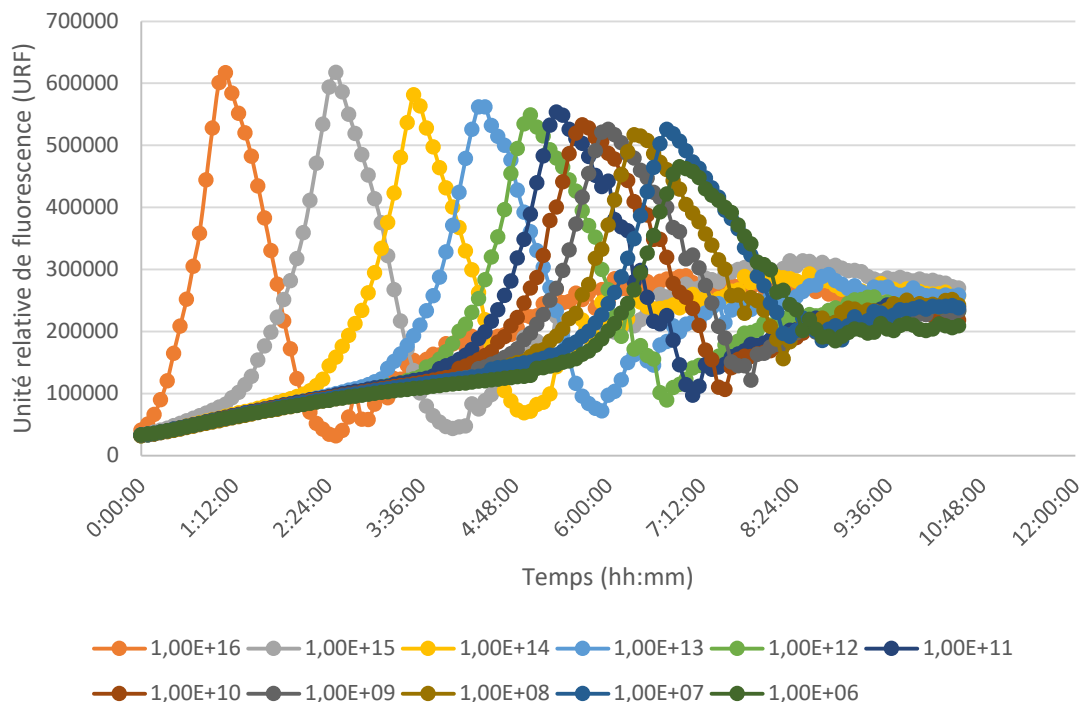
Protocole de quantification sur microplaque des logs de réduction du nombre de colonies bactériennes

1. Principe de la méthode

La méthode de quantification des logs de réduction du nombre d'unités formatrices de colonies (UFC) sur microplaque par la mesure de la fluorescence de la résazurine a été développée dans le but d'évaluer l'efficacité de produits désinfectants. La méthode vise à remplacer certaines méthodes traditionnelles qui requièrent beaucoup de temps de manipulation et de matériel. Elle a été adaptée de la procédure d'opération standardisée de Sani Marc P031-020 « Procédure de test d'efficacité germicide de désinfectants liquides (méthode liquide-liquide).

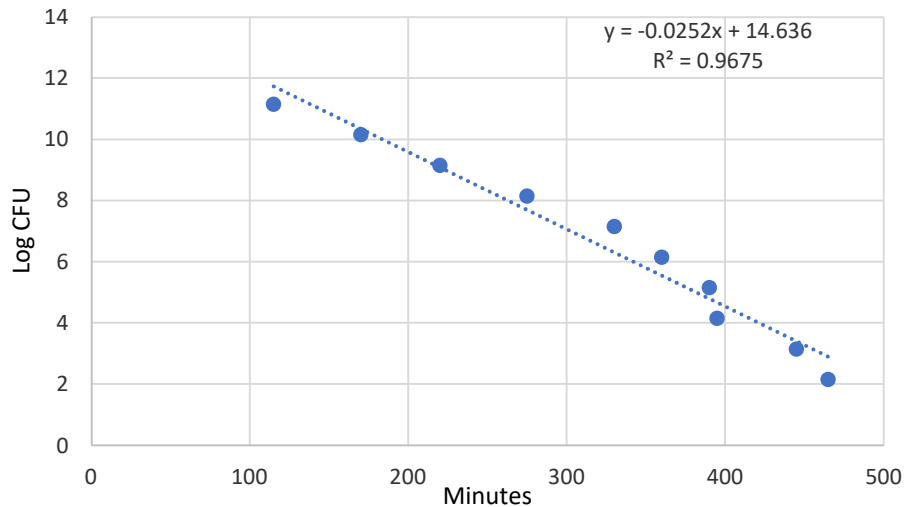
Cette méthode quantitative de détection de l'activité antimicrobienne permet de tester 11 désinfectants en un seul test. Elle est basée sur la cinétique de réduction de la résazurine en résorufine et subséquentement en hydrorésorufine.

La résazurine est un composé non fluorescent qui est réduit en résorufine, fluorescent dans le rouge, par le métabolisme cellulaire des bactéries. Une fois la résazurine complètement réduite en résorufine, l'intensité de fluorescence est à son maximum. La résorufine est ensuite réduite, encore par le métabolisme cellulaire, en hydrorésorufine, non fluorescent. Le temps nécessaire pour atteindre la valeur maximale de fluorescence ayant une relation linéaire au nombre de bactéries dans une concentration très large (1×10^2 à 1×10^{12} UFC/mL), il devient possible, avec une courbe standard, de mesurer les logs de réduction de bactéries dans un échantillon. Le



graphique ci-dessous présente la cinétique de fluorescence de la rézasurine pour des bouillons de culture de *E. coli*, de concentrations allant de $1,00 \times 10^{16}$ à $1,00 \times 10^6$ CFU/mL.

En utilisant la donnée du temps (minute) auquel est mesurée l'intensité maximale de fluorescence (le « pic ») pour chacune des courbes du graphique, il est possible de calculer une droite de régression et ainsi obtenir une courbe standard pour estimer le nombre de CFU, comme présenter dans le graphique ci-dessus.



2. Matériel

- Bouillon de neutralisant Lethen modifié (se référer à la procédure P031-020 pour la préparation)
- Bouillon tryptic soy (TSB)
- Gélose tryptic soy (TSA)
- Tubes à dilution
- Bac de préparation de plaque 96 puits (ou tubes à dilution) (https://www.coleparmer.ca/i/argos-technologies-trifill-trifill-multichannel-pipette-reservoir-10-package/2520071?PubID=OF&persist=True&ip=no&gclid=Cj0KCCQjwn8_mBRCLARIsAKxi0GJK5300sOcv1Y1wNoO81x8Dy7Guk7L22xi0Ce9QmoQzEaAoeuEALw_wcB)
- Microplaques 96 puits noir à fond plat transparent stériles avec couvert
- Pipette multicanale
- Rézasurine (2,45 gr/litre)
- Lecteurs de microplaques à fluorescence
- Incubateur à 37 °C



3. Protocole de lectures du lecteur de microplaques

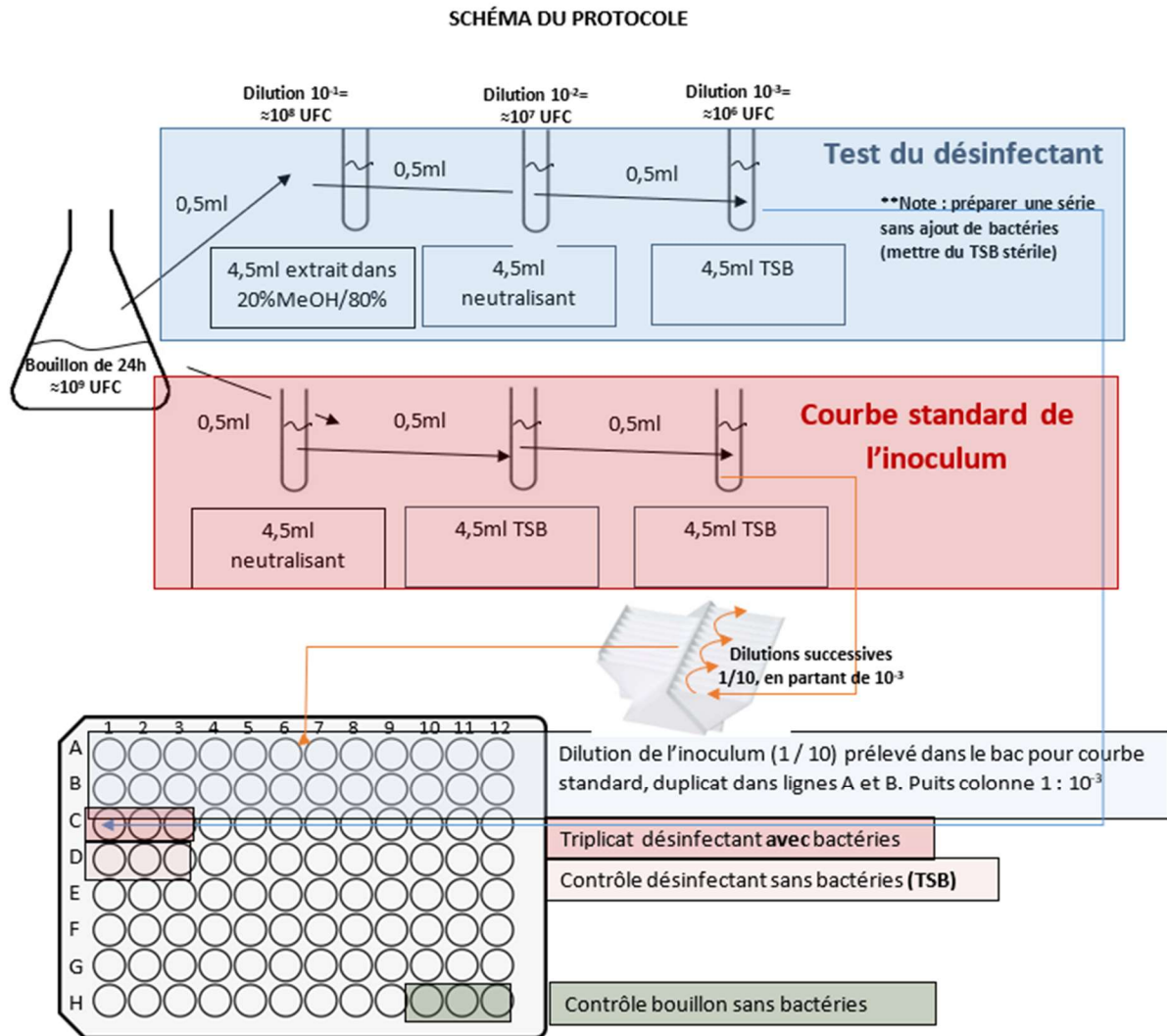
Selon le fonctionnement de l'appareil, mettre en marche le lecteur de plaque et ouvrir le protocole de lecture. Pour une première réalisation du protocole de lecture, il faut d'abord en faire le montage dans le logiciel du lecteur. Les conditions à intégrer dans le protocole sont les suivantes :

- Lecture en fluorescence en cinétique aux 10 minutes pendant 12h-15 h
- Excitation émission 550-590 nm
- Agitation orbitale entre chacune des lectures

- Température plus élevée au-dessus de la plaque qu'en dessous pour éviter la condensation dans le couvercle (un gradient de 2 °C)
- Température d'incubation de 37 °C

4. Test de désinfection et préparation de la plaque

En premier lieu, préparer dans Excel ou autres le plan de la plaque (voir canevas à la dernière page du protocole).



4.1. Test du désinfectant

- Pipetter 0,5 mL d'inoculum 24h (entre 10^8 - 10^{10}) dans un tube contenant 4,5 mL de solution désinfectante à la concentration désirée. Après le temps de contact souhaité pour le test, prélever 0,5 mL et mettre dans un tube contenant 4,5 mL de bouillon de neutralisant.
- Prélever 0,5 mL du tube contenant le neutralisant et diluer dans un tube contenant 4,5 mL de bouillon TSB. Cette étape est nécessaire avant de faire la lecture de la plaque, car le bouillon neutralisant peut causer des interférences avec la rézasurine.

- C. Prélever 200 µL et déposer dans le puits C1 de la microplaque. Répéter dans les puits C2 et C3.
- D. Répéter les étapes 1 et 2, mais sans mettre d'inoculum de bactéries, donc ajouter plutôt du TSB pour préparer le « contrôle désinfectant sans bactéries ».
- E. Prélever 200 µL et déposer dans les puits D1 à D3.

4.2. Courbe standard de l'inoculum

- F. Pipetter 0,5 mL d'inoculum 24h (entre 10^8 - 10^{10}) dans un tube contenant 4,5 mL de bouillon neutralisant.
- G. Prélever 0,5 mL et le diluer dans 4,5 mL de TSB.
- H. Prélever 0,5 mL de ce tube et le diluer à nouveau dans 4,5 mL de TSB afin d'avoir le même niveau de dilution que le test du désinfectant.
- I. Prélever 1 mL et déposer dans la case 1 du bac.
- J. Ajouter 0,9 mL de TSB dans les cases 2 à 12.
- K. Prélever 0,1 mL dans la case 1 et ajouter à la case 2. Prélever 0,1 mL dans la case 2 et ajouter à la case 3. Continuer cette dilution successive jusqu'à la case 12.
- L. Avec la pipette multicanale, prélever 200 µL dans les 12 cases contenant les dilutions de l'inoculum et les déposer dans les puits A1 à A12.
- M. Répéter 12 et déposer dans B1 à B12.
- N. Conserver les dilutions pour étalement suivant le démarrage de la lecture de la plaque (voir 2.3).
- O. Étaler 0,1 mL de chacune des dilutions sur des géloses TSA.
- P. Incuber à 37 °C pendant 24h
- Q. Compter les unités formatrices de colonies (UFC)

4.3. Lecture de la plaque

- R. Ajouter 40 µL de RZ dans tous les puits.
- S. Mettre le couvercle sur la plaque et mettre la plaque dans le lecteur.
- T. Démarrer le protocole de lecture.

4.4 Étalement de l'inoculum

- U. Étaler 0,1 mL de chacune des dilutions sur des géloses TSA (**commencer avec les plus dilués**).
- V. Incuber à 37 °C pendant 24h.
- W. Compter les unités formatrices de colonies (UFC).

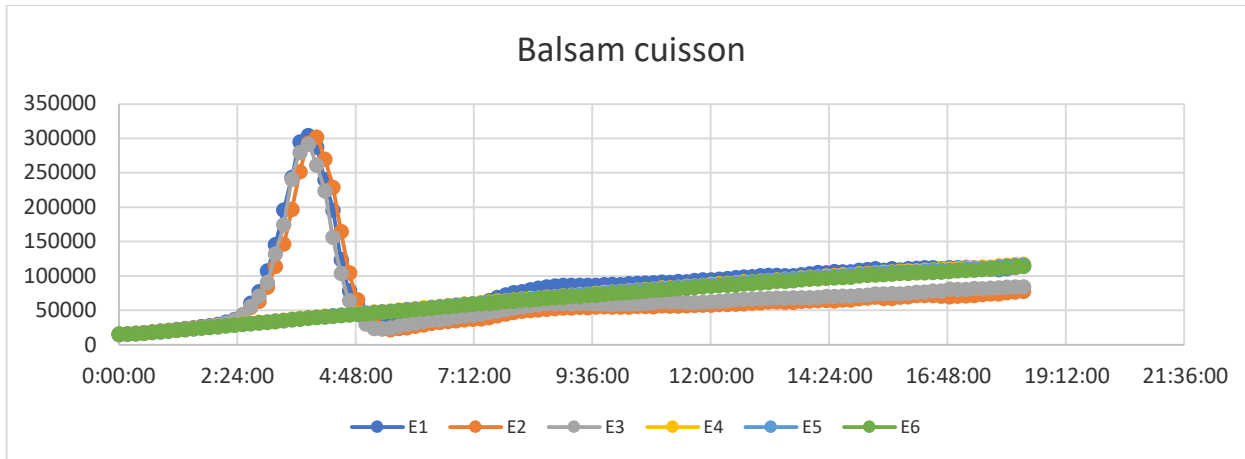
5. Analyse des résultats

Après la période de lecture, enregistrer les données dans une feuille Excel. L'intensité de fluorescence mesurée pour chaque puits apparaîtra en colonne, selon le temps de lecture, comme dans l'image ci-dessous.

Time	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	B1	B2	B3	B4
00:00:31	14695	14596	14398	14259	14012	14564	15415	15440	14989	14967	14281	15216	14176	13547	13391	12899
00:10:31	15900	15404	15038	14996	15037	15394	16361	16138	15778	15663	15102	16297	15171	14284	14030	13391
00:20:31	17641	16913	16194	16294	16200	16564	17647	17431	17029	17088	16498	17564	16667	15546	15229	14491
00:30:31	19679	18490	17898	17847	17629	18142	19263	19048	18667	18624	18027	19176	18139	16799	16649	15795
00:40:31	22112	20168	19710	19516	19589	19848	21090	20770	20577	20280	19810	20946	20566	18397	18288	17357
00:50:31	24636	22076	21436	21264	21197	21570	22972	22785	22329	22107	21569	22738	22914	20131	19740	19106
01:00:31	27769	24048	23514	23137	23165	23619	25049	24635	24397	23978	23423	24575	25682	21883	21554	20531
01:10:31	32297	26084	25245	25079	24807	25347	27319	26545	26216	25942	25253	26548	29139	23645	23328	22662
01:20:31	41197	28382	27536	26985	26962	27460	29422	28731	27911	27926	27279	28340	36747	25661	25374	24375
01:30:31	56587	30433	29202	28893	29045	29286	31331	30784	30148	30082	29156	29956	48839	27739	27046	26118
01:40:31	77278	32991	31194	31246	30936	31068	33319	32697	32198	31852	30787	32058	67023	29818	29071	28200
01:50:31	95713	35488	33408	32829	32981	32966	35385	34513	33820	33634	32859	33874	89216	32494	30906	29782
02:00:31	107961	38802	35568	34728	34680	35073	37360	36869	36003	35527	34508	35507	114218	35824	32946	31390
02:10:31	159284	43998	37628	36872	36610	37069	39557	38818	38177	37441	36462	37857	140447	40351	34775	33318
02:20:31	229445	52017	39922	38473	38484	38901	41508	40492	39862	39468	38211	39722	166775	48060	36647	34849
02:30:31	277031	64436	42305	40759	40645	40893	43739	42706	41753	41114	40250	41312	204250	58951	39080	36661
02:40:31	309102	81902	45625	42889	42224	42690	45377	44725	44002	42895	42080	43361	226301	73722	41745	38707
02:50:31	294768	102735	50277	44923	44642	44358	47629	46563	45896	44857	43978	44959	245178	92296	46026	40349
03:00:31	252862	118489	55720	47148	46103	46774	49337	48171	47681	46940	45579	47159	255721	109386	51548	42516
03:10:31	182252	181003	64837	49702	48592	48647	51216	50395	49420	48767	47551	48756	227630	126660	59958	44773
03:20:31	121625	214562	81091	52487	50387	50440	53557	52059	51279	50271	49004	50384	173410	145623	72762	47421
03:30:31	73618	268028	98348	56400	52109	52297	55427	53711	53252	52000	50798	52306	124547	165074	88993	50845
03:40:31	42430	307143	123892	60888	54416	54230	57123	56127	54927	54292	52239	54182	78322	193870	106677	55387
03:50:31	28475	310804	168294	67889	56811	56687	59691	57665	56891	55862	53955	55818	45036	212922	123481	61876
04:00:31	23113	282793	230562	76783	60352	58572	61524	59698	58720	57794	55776	57823	26480	226367	140090	71417
04:10:31	19906	238902	269228	91803	63747	60599	63894	61649	60895	59470	57524	59791	18176	231346	155789	84086
04:20:31	19412	173211	306910	110318	69128	63429	66165	63925	62991	61302	59017	61454	15658	197513	172952	97224
04:30:31	19117	114681	312795	129894	76809	66832	68953	66133	64281	63171	60655	63294	14755	147975	210815	111810
04:40:31	19706	75422	280225	149061	86231	71914	72136	68120	66175	65103	62891	65567	14313	109766	221788	127888

Pour pouvoir faire l'analyse des données, vous devez télécharger sur votre ordinateur, dans un fichier qui ne sera pas déplacé au fil du temps, le document Excel de macro complémentaire « TEMPSPIC ». Se référer au document Excel « Instruction pour la détection des pics » pour les instructions sur l'utilisation de la macro. Cette macro sert à identifier le temps auquel le pic de fluorescence survient, en plus de convertir le format 00 :00 :00 en minutes.

L'analyse commence par visualiser graphiquement les données (dilutions de l'inoculum dans les lignes A et B et chaque désinfectant testé) afin de confirmer la présence des pics dans chacun des puits avec bactéries et l'absence de pics dans les puits sans bactérie, comme l'exemple du graphique ci-dessous :



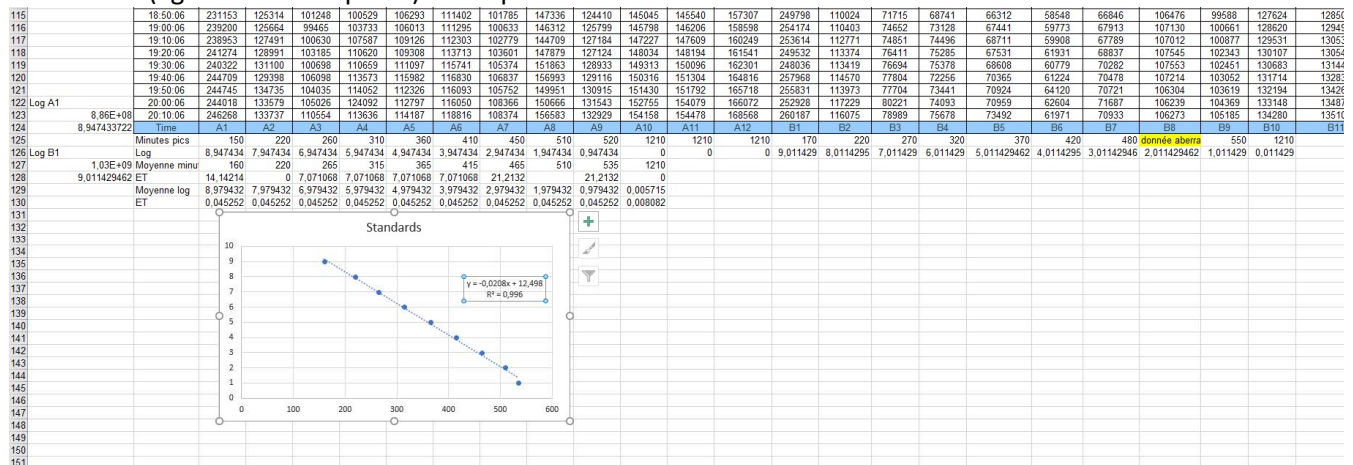
Si les courbes semblent convenables, procéder au calcul de la courbe standard

5.1 Courbe standard

Copier les données brutes et coller dans une nouvelle feuille dans le document Excel.

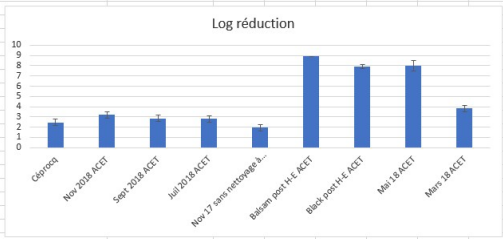
Supprimer les données superflues, c'est-à-dire les données au-delà desquelles aucun pic n'est mesuré pour aucun des puits de la plaque. Par exemple, dans le graphique ci-dessus, les données au-delà de 07 : 12 pourraient être supprimées pour faciliter l'analyse.

Sous les colonnes de données, insérer la formule de la macro pour détecter à quelle minute le pic de fluorescence est mesuré (ligne « minutes pics »). Faire pour toutes les colonnes.



Sous la ligne minute pics, entrer le compte des étalements de l'inoculum (10^{-3} à 10^{-15}) en log des lignes A et B. Calculer les moyennes et écarts types « minutes pics » et « log » de A1 et B1, A2 et B2, etc. Faire le graphique des moyennes de logs en fonction des moyennes minutes pics. Insérer la droite de régression, l'équation de la droite et le R^2 .

5	18 50 06	214426	86385	88983	138028	137792	133117	84414	82045	96133	139292	140430	155167	211495	143330	96572	145894	145384	58438	9879
6	19 00 06	215413	87008	89011	140145	138961	133457	84734	84133	95286	139969	142154	156027	211062	146367	98701	147075	146619	57985	1012
7	19 10 06	219549	89654	89167	140220	140138	134553	84380	85139	98709	141290	142656	157846	216407	144239	99278	147617	147444	58053	1018
8	19 20 06	224898	93001	90236	140853	140402	135385	89042	86288	103184	142684	143516	158834	215570	144592	98387	148533	148112	60700	1008
9	19 30 06	228346	92799	90375	141826	141007	136158	87172	88640	101259	142899	144443	160349	215723	145271	99541	149802	148823	63310	1037
0	19 40 06	229988	90709	90608	142256	142072	137205	87494	89791	105331	143237	145383	160883	219479	145585	101441	150631	149594	64552	1032
1	19 50 06	228453	93571	91130	143749	143812	138064	89800	90222	106550	144522	144956	162065	220418	147764	100529	151519	150466	65463	1038
2	20 00 06	221819	94399	90425	144606	144556	139037	89269	92223	105948	145855	146953	163105	220699	146349	100447	152211	151104	67396	1031
3	20 10 06	227427	96510	93099	145428	144985	138782	89625	93800	107037	146053	147337	164290	220555	147038	102610	153171	152146	69590	1039
4	Time	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
5	Minutes pic	290	300	270	1210	1210	1210	310	320	340	1210	1210	1210	320	290	310	1210	1210	930	;
6	Moyenne log inoculum	Log estimé	6,466	6,258	6,882	0	0	0	6,05	5,842	5,426	0	0	0	5,842	6,466	6,05	0	0	6,
7	8,979431592																			
8																				
9																				
0	$y = -0,0208x + 12,498$																			
1		C1	6,466	2,513432	Céprocq	2,444098														
2		C2	6,258	2,721432																
3		C3	6,882	2,097432																
4		C4	0	8,979432																
5		C5	0	8,979432																
6		C6	0	8,979432																
7		C7	6,05	2,929432	Nov 2018 ACFT	3,206765														
8		C8	5,842	3,137432																
9		C9	5,426	3,553432																
0		C10	0	8,979432																
1		C11	0	8,979432																
2		C12	0	8,979432																
3		D1	5,842	3,137432	Sept 2018 ACFT	2,860098														
4		D2	6,466	2,513432																
5		D3	6,05	2,929432																
6		D4	0	8,979432																
7		D5	0	8,979432																
8		D6	0	8,979432																
9		D7	6,466	2,513432	Juil 2018 ACFT	2,790765														
0		D8	5,842	3,137432																
1		D9	6,258	2,721432																
2		D10	0	8,979432																
3		D11	0	8,979432																
4		D12	0	8,979432																
5		E1	7,298	1,681432	nettoyage à l'h	1,958765														
6		E2	7,09	1,889432																
7		E3	6,674	2,305432																
8		E4	0	8,979432																
9		E5	0	8,979432																
0		E6	0	8,979432																



Copier cette feuille dans une nouvelle.

Supprimer les colonnes des dilutions d'inoculum pour conserver seulement les désinfectants testés et les contrôles. Entrer la formule de la droite dans la ligne sous « minutes pics » pour calculer le log.

Calculer finalement pour chaque désinfectant le log de réduction en soustrayant le log estimé par la régression, de la moyenne des logs dénombrés dans les puits A1 et B1.

PLAN DE PLAQUE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ANNEXE G

Facture d'électricité de Kemitek



Numéro de compte 299 003 608 450 Numéro de facture 628 902 853 951 Numéro de client 100 360 732 Page 2 de 3

Détail du lieu de consommation

835 rue Mooney
Thetford Mines QC G6G 0A5

Propriétaire

Numéro de contrat
3004 24632

DÉTAIL DE LA CONSOMMATION

Du 13 décembre 2023 au 12 janvier 2024 (31 jours)

Numéro de compteur : G4AE0088254

Nouveau relevé	Relevé précédent	Différence		Multiplicateur	Consommation
01087	- 00990	= 97	x	1200	= 116 400 kilowattheures (kWh)
0.221			x	1200	= 265,2 kilowatts (kW)
0.229			x	1200	= 274,8 kilovoltampères (kVA)

DÉTAIL DE LA PUISSANCE

Du 13 décembre 2023 au 12 janvier 2024 (31 jours)

Puissance minimale	238,7 kilowatts (kW)
Puissance réelle	265,2 kilowatts (kW)
Puissance apparente	274,8 kilovoltampères (kVA)
90 % de la puissance apparente	247,3 kilowatts (kW)

Facteur de puissance : 96,5 % Facteur d'utilisation : 59,0 %

DÉTAIL DES COÛTS – TARIF GÉNÉRAL M DE MOYENNE PUISSANCE

Du 13 décembre 2023 au 12 janvier 2024 (31 jours)

Puissance à facturer	265,2 kW	
Coût de la puissance facturée	265,2 kW x 16,139 \$ x 31 j + 30 j	4 422,73 \$
Consommation totale	116 400 kWh	
Jusqu'à 210 000 kWh par mois	116 400 kWh x 0,05567 \$	6 479,99 \$
Total partiel		10 902,72 \$
TPS (5,0 %)		545,14 \$
TVQ (9,975 %)		1 087,55 \$
Total des coûts de l'électricité		12 535,41 \$

P00012464/0002/464_24_7255...SEL/



Timbre de caisse

Hydro-Québec

C. P. 11022, succ. Centre-ville
Montréal (Québec) H3C 4V6

RÉFÉRENCES

1. United Nations. Global issues - Population. *United Nations*. Available at: <https://www.un.org/en/global-issues/population#:~:text=The%20global%20human%20population%20reached,and%20%20billi on%20since%201998>. Accessed February 01, 2025.
2. United Nations. International Day of Awareness on Food Loss and Waste Reduction. *United Nations*. Available at: <https://www.un.org/en/observances/end-food-waste-day>. Accessed February 01, 2025.
3. Sarrazin S. Petit tour du monde de la poutine. *La Presse*. February 04, 2024. Available at: <https://www.lapresse.ca/voyage/2024-02-03/petit-tour-du-monde-de-la-poutine.php>.
4. Statistique Canada. Tableau 32-10-0358-01. Superficie, production et valeur à la ferme des pommes de terre. *Statistique Canada*. January 21, 2025. Available at: https://www150.statcan.gc.ca/t1/tbl1/fr/tv.action?pid=3210035801&request_locale=fr.
5. Sankaran S. REAL-TIME SENSING OF POTATO POSTHARVEST QUALITY FOR CROP LOSS MANAGEMENT IN BULK STORAGE ENVIRONMENT
6. Dako E, Jankowski CK, Gnimassou YM, Lebeau D. Study of inhibition of germination of potato by ethylene. *Heliyon*. February 2021;7(2).
7. University of California Sustainable Agriculture Research and Education Program. 1,4-dimethylnaphthalene for use as a post-harvest adjuvant. *USDA*. March 11, 2004. <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Dimethylnaphthalene%20TR.pdf>. Accessed February 02, 2025.
8. Pest Management Regulatory Agency. Registration Decision RD2014-01 - 3-decen-2-one. *Health Canada*. March 4, 2014. <https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/cps->

- [spc/alt_formats/pdf/pubs/pest/decisions/rd2014-01/rd2014-01-eng.pdf](https://www.efsa.europa.eu/en/press-material/press-conferences/2014/01/2014-01-02). Accessed February 02, 2025.
9. Campbell MA, Gleichsner A, Alsbury R, Horvath D, Suttle J. The sprout inhibitors chlorpropham and 1,4-dimethylnaphthalene elicit different transcriptional profiles and do not suppress growth through a prolongation of the dormant state. *Plant molecular biology*. May 2010;1-2:181-189.
 10. Paul V, Ezekiel R, Pandey R. Sprout suppression on potato: need to look beyond CIPC for more effective and safer alternatives. *J Food Sci Technol*. January 2016;1:1-18.
 11. Mélin J. Draft Motion for a Resolution, Committee on the Environment, Public Health and Food Safety. *European Parliament*. December 03, 2020.
https://www.europarl.europa.eu/meetdocs/2014_2019/plmrep/COMMITTEES/ENVI/DV/2020/12-10/D068967_RPS_Chlorpropham_1219871EN.pdf.
 12. CCMF. Des forêts saines. *Conseil canadien des ministres des forêts*. January 25, 2025. Available at: <https://www.ccmf.org/des-for%C3%AAs-saines/des-forets-vastes-et-abondantes-entrefilet/#:~:text=Le%20couvert%20forestier,le%20plus%20bois%C3%A9%20au%20monde>.
 13. Boivin M, Bourdeau N, Barnabé S, Desgagné-Penix I. Black spruce extracts reveal antimicrobial and sprout suppressive potentials to prevent potato (*Solanum tuberosum* L.) losses during storage. *Journal of Agriculture and Food Research*. July 2021:100187.
 14. O'Neil MJ HPDPRK(. The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. *Merck Index*. 15th ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2013.
 15. Meng ZL, al. Study on Synthesizing Isobornyl Acetate/Isoborneol from Camphene Using α -Hydroxyl Carboxylic Acid Composite Catalyst. *Molecules*. 2023;28(4):1875.

16. Panten J, Surburg H. Flavors and fragrances, 2. Aliphatic compounds. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.; 2015.
17. Anastas PT, Warner JC. *Green Chemistry: Theory and Practice*. New-York: Oxyford University Press; 1998.
18. Mills AAS, Platt HWB, Hurta RAR. Sensitivity of *Erwinia* spp. to salt compounds in vitro and their effect on the development of soft rot in potato tubers in storage. *Postharvest Biology and Technology*. March 2006:208-214.
19. Syngenta Group Company. Stadium 31050 - Safety Data Sheet. *Syngenta*. February 10, 2023. https://assets.syngenta.ca/pdf/ca/labels/STADIUM_31050_en_pamphlet.pdf. Accessed 2025.
20. Al-Mughrabi KI. Les biofongicides offrent une protection contre les maladies des pommes de terre en post-récolte. *Agriculture Canada*. July 28, 2021. Available at: <https://agriculture.canada.ca/fr/production-agricole/protection-cultures/ressources-matiere-lutte-antiparasitaire-agriculture/biofongicides-offrent-protection-contre-maladies-pommes-terre-post-recolte>.
21. Belchim Crop Protection Canada. Phostrol Fungicide Technical Data Sheet. *Belchim Canada*. December 2021. <https://www.belchimcanada.com/Label/73/E/1.pdf>.
22. St-Pierre A, Blondeau D, Bourdeau N, Bley J, Desgagné-Pénix I. Chemical Composition of Black Spruce (*Picea mariana*) Bark Extracts and Their Potential as Natural Disinfectant. *Industrial Biotechnology*. June 2019;3:219-231.
23. Zhang C, Cui F, Zeng Gm. Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence. *Science of the Total Environment*. March 2015;518-519:352-362.

24. Boivin M. Étude des potentiels antimicrobien et antigerminatif d'extraits forestiers pour limiter les pertes de pommes de terre (*Solanum Tuberosum* L.) durant leur entreposage
25. Golets M. Heterogeneously Catalyzed Valorization of Monoterpenes to High Value-added Chemicals
26. Salehi B, Upadhyay S, Orhan IE, al. Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules*. November 2019;9(11):738.
27. TGSC. (+)-camphene. *The Good Scents Company*. Available at: <https://www.thegoodscentscopy.com/data/rw1106261.html>. Accessed September 28, 2025.
28. Millipore Sigma. (-)-Bornyl Acetate. *Millipore Sigma*. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/product/aldrich/b55203?srsId=AfmBOooqfqTsk34YG3RnXCaiNom4fjigp0htdRrMzPOrIKC5BFWOc-NT>. Accessed September 28, 2025.
29. O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, eds. *The Merck Index*. 13 ed. Whitehouse Station: Merck Research Laboratories; 2001.
30. Smith SW. Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different. *Toxicological Sciences*. July 2009;110(1):4-30.
31. Coelho MM, Fernandes C, Remiao F, Tiritan ME. Enantioselectivity in Drug Pharmacokinetics and Toxicity: Pharmacological Relevance and Analytical Methods. *Molecules*. May 2021;26(11):3113.
32. Agilent Technologies. Chiral GC Columns - Cyclosil-B Columns. *Agilent Technologies*. Available at: <https://www.agilent.com/en/product/gc-columns/chiral-gc-columns/cyclosil-b-columns>. Accessed February 20, 2023.

33. Agilent Technologies. Citrus Flavored Carbonated Beverage. *Agilent Technologies Library*. Décembre 2005. <https://www.agilent.com/cs/library/chromatograms/c740.pdf>.
34. Avantor. Chromatography Solutions. *Chiral GC Separation using the Avantor Hichrom HI-DEX G-01 Phase*. <https://www.mac-mod.com/wp-content/uploads/Chiral-GC-Separation-Using-a-Cyclodextrin-Phase.pdf>. Accessed March 2023.
35. Theodorou V, et al. Mild Alkaline Hydrolysis of Hindered Esters in Non-aqueous solution. *Arkivoc*. October 2018;VII:308-319.
36. Depovere P. Dérivés acides carboxyliques - La chimie des esters. *Traité de chimie organique*. 6th ed. Louvain-La-Neuve: De Boeck; 2015.
37. Yang MY, Khine AA, Liu JW, al. Resolution of isoborneol and its isomers by GC/MS to identify "synthetic" and "semi-synthetic" borneol products. *Chirality*. November 2018;11:1233-1239.
38. Batista ANL, al. Enantiomeric Mixtures in Natural Product Chemistry: Separation and Absolute Configuration Assignment. *Molecules*. February 2018;23(2):492.
39. Finefield J, al. Enantiomeric natural products: occurrence and biogenesis. *Angew Chem Int Ed Engl*. May 2012;51(20):4802-36.
40. Kačániová M, al. Citrus limon Essential Oil: Chemical Composition and Selected Biological Properties Focusing on the Antimicrobial (In Vitro, In Situ), Antibiofilm, Insecticidal Activity and Preservative Effect against *Salmonella enterica* Inoculated in Carrot. *Plants (Basel)*. February 2024;13(4):524.
41. Saeidnia S. Turpentine. In: Wexler P, ed. *Encyclopedia of Toxicology*. 4th ed: Academic Press; 2014.

42. Ragnar M, Henriksson G, Lindstrom ME, Winby M, Blechschmidt J, Heinemann S. Pulp. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; 2014.
43. Long Y, Shang S, Fang Y. Dimethyl sulfide emission behavior from landfill site with air and water control. *Biodegradation*. December 2017;5(6):327-335.
44. Rinzema A, Lettinga G. Anaerobic treatment of sulfate-containing waste water. *Biotreatment systems*. Vol III. Boca Raton: CRC Press Inc.; 1988.
45. Abe K, Machida W. Oxidation of Methanethiol and Dimethyl Sulfide in Exhaust Gas by Sodium Hypochlorite Solution. *Journal of Japan Society of Air Pollution*. 1980;15(4):163-166.
46. Dimethyl Sulfide. *Chemical Book*. January 30, 2025. Available at: https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_75-18-3_1HNMR.htm.
47. Wu CY, Chou MS, Lin JH. Oxidative scrubbing of DMS-containing waste gases by hypochlorite solution. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2014;45(2):596-602.
48. Ringgani R, Budiman A. Isomerization of Crude Indonesian Turpentine Contains Alpha Pinene to Produce Camphene over Resin Catalyst. Paper presented at: Regional Conference on Chemical Engineering, 2014; Yogyakarta.
49. Alsalmeh A, Kozhevnikova E, Kozhevnikov I. α -Pinene isomerisation over heteropoly acid catalysts in the gas-phase. *Applied Catalysis A : General*. December 2010;390(1-2):219-224.
50. Agabekov VE, Sen'kov M, Sidorenko AY, Tuyen ND, Tuan VA. New α -pinene Isomerization Catalysts. *Catalysis in Industry*. December 2011;3(4):319-330.
51. Wroblewska A, Miadlicki P, Makuch E. The isomerization of α -pinene over the Ti-SBA-15 catalyst- the influence of catalyst content and temperature. *Reac Kinet Mech Cat*. 2016;119:641-654.

52. Simakova IL, Solkina YS, & al. Selective vapour-phase α -pinene isomerization to camphene over gold-on-alumina catalyst. *Applied Catalysis A: General*. 2010;385:136-143.
53. Huang G, Zhou S, Liu J, Su S, Yin D. Highly-selective solvent-free catalytic isomerization of α -pinene to camphene over reusable titanate nanotubes. *RSC Advances*. March 2020(18):10606-10611.
54. Chin Trento. Titanium Dioxide Polymorphs: Rutile vs. Anatase. *Stanford Advanced Materials*. December 3, 2024. Available at: <https://www.samaterials.com/titanium-dioxide-polymorphs-rutile-vs-anatase.html#:~:text=Anatase%2C%20with%20its%20higher%20photocatalytic,%2C%20coatings%2C%20and%20electronic%20components.>
55. De Gscheidmeier M, De Haberlein H, Inventors. Méthode pour préparer du camphène par réarrangement α -pinène. 2191300, 1996.
56. Lee K, Mazare A, Schmuki P. One-Dimensional Titanium Dioxide Nanomaterials: Nanotubes. *Chemical Reviews*. August 2014;114(19).
57. De Sousa LB, Speranza JT, Condotta R, Cella R. Heterogeneous catalyzed isomerization of turpentine oil by ordered mesoporous materials like M41S structures. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 2022:1-12.
58. Miadlicki P, Wroblewska A, Kielbasa K, Koren ZC, Michalkiewicz B. Sulfuric acid modified clinoptilolite as a solid green catalyst for solvent-free α -pinene isomerization process. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2021:111266.
59. Darvas F, Dorman G, Hessel V, V. Ley S. *Volume 1 Flow Chemistry - Fundamentals*. 2nd ed. Berlin: De Gruyter; 2021.

60. Mukhin N, Jha P, Abolhasani M. The role of flow chemistry in self-driving labs. *Matter*. July 2025;8(7):102205.
61. The E-Series Flow Chemistry System. *Vapourtech*. February 11, 2025. Available at: <https://www.vapourtec.com/products/e-series-flow-chemistry-system-overview/>.
62. Mazzetti MJ, Pardue J, Rantell T, Grulke EA. Porosity of carbon nanotubes. 2000;17.
63. Yang QH, Cheng HM. Chapter 12 - Carbon nanotubes: Surface, porosity, and related applications. *Carbon Nanotechnology - Recent Developments in Chemistry, Physics, Materials Science and Device Applications*: Elsevier; 2006.
64. Liu PS, Chen GF. Chapter Nine - Characterization Methods: Basic Factors. *Porous Materials - Processing and Applications*: Butterworth-Heinemann; 2014.
65. Michael SB, March J. *March's Advanced Organic Chemistry*. 5 ed. New York: Wiley-Interscience; 2001.
66. Scholz Fea. Crystal Structure Determination of the Nonclassical 2-Norbornyl Cation. *Science*. 2013;341:62-64.
67. Gscheidmeier M, al, Inventors. PROCESS FOR THE CONTINUOUS PREPARATION OF TERPENE ESTERS - EXPIRED. US5596127A, 1997.
68. DuPont. DuPont™ AmberLyst™ 15DRY Polymeric Catalyst. *DuPont Water Solutions*. February 2023. <https://www.dupont.com/content/dam/water/amer/us/en/water/public/documents/en/IER-AmberLyst-15DRY-PDS-45-D00927-en.pdf>.

69. Sigma-Aldrich. Amberlyst® 15 Ion Exchange Resin. *Millipore Sigma*. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/CA/fr/product/mm/115635>. Accessed March 01, 2025.
70. Fuzhou U, Inventor. Method for preparing isobomyl acetate through camphene esterification. CN102276453A, 2011.
71. De Meireles ALP, Da Silva Rocha KA, Kozhevnikov IV, Gusevskaya EV. Esterification of camphene over heterogeneous heteropoly acid catalysts: Synthesis of isobornyl carboxylates. *Applied Catalysis A : General*. 2011;409(410):82-86.
72. Castanheiro JE, Fonseca IM, Ramos AM, Vital J. Acetoxylation of camphene catalysed by beta zeolite. *Catalysis Communications*. 2008;9(13):2205-2208.
73. Atkins PW, De Paula J. *Chimie Physique*. 2 ed. Bruxelles: De Boeck & Larcier; 2004.
74. Wu W, Chen Y, Liu N, Shi L, Meng X. Synthesis of Camphene by α -Pinene Isomerization Using Acid Nano Titanium Dioxide Catalysts. *New Journal of Chemistry*. March 2023(14):6822-6832.
75. Pacheco BS, Nunes CFP, al. Eco-friendly synthesis of esters under ultrasound with p-toluenesulfonic acid as catalyst. *Green Chemistry Letters and Reviews*. July 2014;3:265-270.
76. Kong J, Schleyer PvR, Rzepa HS. Successful Computational Modeling of Isobornyl Chloride Ion-Pair Mechanisms. *J. Org. Chem*. 2010;75:5164-5169.
77. Vaughan WR, Perry Jr R. Racemization in the Camphene Hydrochloride-Isobomyl Chloride Rearrangement. *Journal of the American Chemical Society*. 1953;75(13):3168-3172.
78. Malshe VC, Sujatha ES. Regeneration and reuse of cation-exchange resin catalyst used in alkylation of phenol. *Reactive and Functional Polymers*. 1997;35(3):159-168.

79. Vena Solutions. Industry Benchmarks of Gross, Net and Operating Profit Margins. *Vena Solutions*. August 23, 2024. Available at: <https://www.venasolutions.com/blog/average-profit-margin-by-industry>.
80. Comité Références économiques. Pomme de terre de table - Budget - 2019. *Centre de référence an agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ)*. 2019. <https://www.craaq.qc.ca/Publications-du-CRAAQ/pomme-de-terre-de-table-budget-2019/p/PREF0090>.
81. Banque du Canada. Inflation Calculator. *Banque du Canada*. Available at: <https://www.bankofcanada.ca/rates/related/inflation-calculator/>. Accessed March 07, 2025.
82. Hubert J, al. In Vitro Dermo-Cosmetic Evaluation of Bark Extracts from Common Temperate Trees. *Planta Med*. June 2016:1351-1358.
83. Silverstein, Basler, Morill. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du proton. *Identification spectrométrique de composés organiques*. Bruxelles: De Boeck & Larcier; 2004.
84. Tanase C, Cosarca S, Muntean DL. A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and their Potential Biological Activity. *Molecules*. March 2019:18.
85. Khanbabaee K, van Ree T. Tannins : Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*. 2001:641-649.
86. Santé Canada. Lignes directrices sur les exigences en matière de qualité pour les biocides : Spécifications du produit et description de l'emballage. *Gouvernement du Canada*. June 20, 2024. Available at: <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/medicaments-produits-sante/biocides/lignes-directrices/exigences-matiere-qualite/specifications-produit-description-emballage.html>.

87. Blondeau D, St-Pierre A, Bourdeau N. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of White Birch (*Betula papyrifera* Marshall) Bark Extracts. *Microbiology Open*. September 2019;9:23.
88. Horsley LH. Tables of Azeotropes and Nonazeotropes. In: Horsley LH, ed. *Azeotropic Data—III*. Vol 116. Washington, DC: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY; 1973.
89. Bourdeau N. Développement d'un biostimulant à partir d'un coproduit obtenu lors de la production d'un extrait d'écorces d'épinette noire antimicrobien. *CRIBIQ*. 2022-2023. Available at: <https://cribiq.qc.ca/portefeuille-de-projets/developpement-d-un-biostimulant-a-partir-d-un-coproduit-obtenu-lors-de-la-production-d-un-extrait-d-ecorces-d-epinette-noire-antimicrobien>.
90. Hydro-Québec. Tarifs pour la clientèle d'affaires. *Hydro-Québec*. 2024. Available at: <https://www.hydroquebec.com/affaires/espace-clients/tarifs/>.
91. Hydro-Québec. Tarif M. *Hydro-Québec*. 2024. Available at: <https://www.hydroquebec.com/affaires/espace-clients/tarifs/tarif-m-general-clientele-moyenne-puissance.html>.
92. Woodruff EB, HBLaTFL. *Steam Plant Operation*. 10th ed: McGraw Hill Professional; 2016.
93. Wulfinghoff DR. *Energy Efficiency Manual: for everyone who uses energy, pays for utilities, controls energy usage, designs and builds, is interested in energy and environmental preservation*: Energy Institute Press; 1999.
94. Woods D. *Rules of Thumb in Engineering Practice*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2007.
95. Ganapathy V. *Industrial Boilers and Heat Recovery Steam Generators: Design, Applications, and Calculations*. 1st ed: Marcel Dekker, Inc.; 2003.

96. Rodríguez M. Optimization of energy efficiency in industrial boilers. *INSPENET*. June 1, 2024.
Available at: <https://inspenet.com/en/articulo/energy-efficiency-in-industrial-boilers/>.
97. ChemicalBook. DL-Isoborneol (124-76-5) 1H NMR. *ChemicalBook*. Available at:
https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_124-76-5_1HNMR.htm. Accessed October 02, 2025.
98. ChemicalBook. L(-)-Borneol (464-45-9) 1H NMR. *Chemical Book*. Available at:
https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_464-45-9_1HNMR.htm. Accessed October 02, 2025.
99. ChemicalBook. Bornyl Acetate (76-49-3) 1H NMR. *ChemicalBook*. Available at:
https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_76-49-3_1HNMR.htm. Accessed October 02, 2025.
100. The Chemical Book. Camphene (79-92-5) 1H NMR. *Chemical Book*. Available at:
https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_79-92-5_1HNMR.htm. Accessed October 02, 2025.
101. ChemicalBook. Isobornyl Acetate (125-12-2) 1H NMR. *Chemical Book*. Available at:
https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_125-12-2_1HNMR.htm. Accessed October 02, 2025.

