HAL
open science

Tensioactifs antioxydants originaux pour la formulation de produits de préservation du bois

Thierry Koumbi Mounanga

To cite this version:

Thierry Koumbi Mounanga. Tensioactifs antioxydants originaux pour la formulation de produits de préservation du bois. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10084 . tel-01748426

HAL Id: tel-01748426

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748426v1

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

U. F. R. ENSTIB
Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits et Environnement
Département de Formation Doctorale Sciences du Bois

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

par

Thierry KOUMBI MOUNANGA

Tensioactifs antioxydants originaux pour la formulation de produits de préservation du bois

Soutenue publiquement le 18 Novembre 2008 devant la commission d'examen :

Président : Alain BREMBILLA, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy
Rapporteurs : Lourdes PEREZ MUÑOZ, Dra CSIC, Barcelone
Stéphane GRELIER, Professeur, Université de Bordeaux
Examinateurs : Gils NEVERS, Responsable Recherche et Développement, OBBIA sas
Christine GERARDIN, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy
(Directrice de thèse)
Philippe GERARDIN, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy
(co-directeur de thèse)

UMR CNRS-UHP 7565, Equipe Synthèse et Assemblage de Composés Amphiphiles
UMR 1093 INRA/ENGREF/UHP, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois
Faculté des Sciences et Techniques, 54506 Vandoeuvre lès Nancy, France

Au Père Selve

A Marvin, Arman, Komby

A Mouanga néa Komby

A mes mères

A ***mono paho, mono motombi, mono nzambé, mono komby, dia mouanga***

Remerciements

Le vieux grand père *Tsogo* disait : *« **Motsogho à ndé ghé biondo, à ghègnaka gho tsina »***. Par cela, il n'y a pas de choix pour toi, que de réussir, encore et toujours plus haut comme ces échos de la forêt *d'ébondjé à mompindi*, où, on entendait : « ***pésu pésu à ma stouhédâ émé*** » autrement dit « si la rivière est sinueuse, c'est parce qu'elle sait trouver toute seule son chemin ». Cela rejoint ce que disait mon grand père Komby, si je m'en souviens bien : « un seul doigt de la main ne peut pas laver tout un visage ». C'est pourquoi, je voudrais encore dire « **merci** » à ceux qui, de près ou de loin, se sont mis autour de moi, pour réaliser ce travail.

Aux membres du jury d'avoir accepté de porter leurs avis sur ce rapport.

Au « feu Père Selve », au grand homme de simplicité effrayante qu'il était, ses éclats de rire, sa moustache et merci de m'avoir accueilli pour la première fois au **LCPOC** (Laboratoire de Chimie Physique Organique et Colloïdale).

A celle qui a toujours su planifier mes synthèses en chimie organique. Celle que Jean-Louis présente comme petite par les centimètres mais très grande par les sentiments, Madame Christine Gérardin, merci du fond du cœur pour tous ces enseignements, vos conseils sur la vie et votre bonne humeur quotidienne.

A celui qui a programmé mes expérimentations en microbiologie, Monsieur Philippe Gérardin, merci pour tous ces enseignements dans le vaste domaine des sciences du bois et aussi, pour vos regards du coin de l'œil suivis de coups de gueule éphémères qui m'ont incité à contourner certaines difficultés d'expérimentations que je croyais impossibles.

Merci à Monsieur Dominique Perrin, de m'avoir encadré dans les réalisations des tests de propriétés antioxydantes et merci pour vos conseils.

A Stéphane Dumarçay et Matthieu Pétrissan d'avoir parfois été là, pour ces coups de pouce dans les expérimentations et les discussions sur les manipulations.

Aux personnels du **LCPOC** devenu **SyACAm** (Synthèse et Assemblage de Composés Amphiphiles), Ludovic Rodehüser, Eric Dumortier, Alain Breambilla, Andreea Pasc, Stéphane Parant, Paule Bazad, Corinne Courtehoux, Jacques Amos, Arnaud Fisher, Jean Louis Fringant et Pascal Lemière pour l'ambiance, l'humour, ces moments partagés autour des pauses cafés et les repas organisés au laboratoire.

Aux bonjours matinaux et chaleureux des technicien(ne)s de surface de la faculté des sciences.

A mes collègues de bureau du **SyACAm** : Patrick Gizzi, Estelle Mayot, Rémi Clerc et Nicolas Dupuy pour toutes ces conversations partagées ensemble.

A mes collègues de paillasse du **Lermab** (Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois) : Kamal, Mounir, Lyne, Ludovic, Privat et à toute l'équipe de la « black connexion ou plutôt bonobos rotuliens » avec qui je partageais plus qu'un repas le midi : Bouddah Poaty Poaty et la tantine Gel, Serge Thierry Lekunungu (le dernier des onclos) et tantine Charlène, Steeve W. Mouguengui (cabezón) et tantine Céline, Gildas Nguila Inari (notre père à tous) et une parmi les tantines, « l'Afrique est ainsi bien représentée mes chers ».

A mes frères du Kenya : Francis G. Mburu, Ambrose K. Kiprop et Peter Sirmah pour m'avoir fait découvrir cette partie là de l'Afrique que je ne connaissais pas.

Je vous souhaite la chance que j'ai d'avoir des parents dans tous les coins de la planète, d'abord « une belle famille adorable » qui ont su faire de moi un enfant de la famille. Mon beau père, en premier pour m'avoir aidé à couper les centaines d'éprouvettes de hêtre aux dimensions de l'expérimentation et ces critiques bienvenues au moment de la rédaction. Ma belle mère pour son rôle de maman. Merci au Papy Bour, Sylvain et Marion, Alain et Rkia, Jean Jacques, Josiane et Robin. A Monique et James, ces parrains qui m'ont déniché en pleine révision durant l'été 2003, dans ce coin au parc du Chamois, et qui depuis n'ont cessé de jouer ce rôle.

Aussi, à tous ceux là bas, au centre ouest de l'Afrique, sur la côte de l'océan atlantique, plus précisément sur la rive gauche de l'estuaire du **Como**, et qui au départ ont traversé la petite rivière de **Mimongo** pour s'installer durant un petit temps, tout près d'un affluent de l'**Ogooué**, ce fleuve du centre du **Gabon** que l'on appelle la **Ngounié** « ***gho nguia téta*** ». A Mounanga et Nongo. A Mighombet, Nzambé, Mbamba, Niembo, Nkoghé, Mounanga, Ndho, Moussouma et tous les enfants. A vous les gars, Diyombi (le costeau), Mabiala (le Big), Mbougou, Moutsoumou, Mboumi, Mvé Ella, Biyogo, Ibuily, Bobi, Fortuné, Raoul, Nguema Assame et Mouloungou.

Au Gouvernement Gabonais de m'avoir permis de faire ce parcours.

A celle qui partage ma vie et en elle, à celui qui se trouve accroché par son nombril. Je refuse pour l'instant, **ma toute dely**, de te dire merci car pour nous c'est le début d'un nouveau commencement alors comprends simplement qu'« ***o ndé gho mo téma hâ mi*** ».

Merci à tous de m'avoir accompagné dans cette évaluation des tensioactifs antioxydants pour les formulations de produits de préservation du matériau bois.

Sans oublier, **toi** qui se dit avoir été oublié.

ABRÉVIATIONS

Aa	:	Acide ascorbique
AcOEt	:	Acétate d'éthyle
ACN	:	Acétonitrile
APTS	:	Acide para toluène sulfonique
BOP	:	Hexafluorosphosphate de benzotriazolyloxytrisdiméthylamino phosphonium
Boc	:	Tertbutyloxycarbonyle
Bz	:	Benzyle
Cn	:	Chaîne aminocarboné à n atomes de carbone
DMF	:	Diméthylformamide
D-glu	:	D-glucuronique acide
Et	:	Ethyle
HMPT	:	Hexaméthylphosphotriamide
IR	:	Infra-Rouge
Me	:	Méthyle
PF	:	Point de fusion
Rdt	:	Rendement
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
THF	:	Tétrahydrofurane
TMS	:	Tétraméthylsilane
(s)	:	Singulet
(t)	:	Triplet
(dd)	:	Doublet de doublet
(q)	:	Quadruplet
(mu)	:	Multiplet
(m)	:	Massif
γ	:	Tension superficielle

Sommaire

INTRODUCTION.....1

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 4

I.1. DEGRADATION DU BOIS 4

I.1.1. RAPPEL SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DU BOIS.....4

I.1.1.1. La cellulose.....5

I.1.1.2. Les hémicelluloses.....6

I.1.1.3. La lignine.....7

I.1.2. LES AGENTS RESPONSABLES DE LA DEGRADATION DU BOIS PAR OXYDATION.....10

I.1.2.1. Les facteurs abiotiques : effet du rayonnement UV 10

I.1.2.2. Les facteurs biotiques : effet des agents de pourriture 12

a) Les peroxydases.....13

b) Les laccases 17

I.1.3. PRESERVATION DU BOIS 22

I.1.3.1. Les différentes classes d'usage et les risques encourus.....22

I.1.3.2. Les fongicides utilisés : historique et situation actuelle 24

I.1.3.3. Environnement et nouvelles alternatives.....26

I.2. LES ANTIOXYDANTS.....27

I.2.1. GENERALITES 27

I.2.2. LES DIFFERENTES FAMILLES D'ANTIOXYDANTS.....28

I.2.2.1. Antioxydants par rupture de chaînes 29

a) Les composés phénoliques.....30

b) Les amines aromatiques 32

I.2.2.2. Les antioxydants préventifs.....36

I.3. LES TENSIOACTIFS 39

I.3.1. AMPHIPHILES ET AGENTS DE SURFACE : DEFINITIONS ET APPLICATIONS D'USAGE 39

I.3.1.1. Définition 39

I.3.1.2. Classification des tensioactifs 41

I.3.1.3. Propriétés et domaines d'utilisation 42

I.3.1.4. Concept de Balance Hydrophile-Lipophille (HLB) et application dans le domaine des tensioactifs non ioniques 46

I.3.2. EXEMPLES DE TENSIOACTIFS A PROPRIETES ANTIOXYDANTES REVELES DANS LA LITTERATURE 47

II. MATERIELS ET METHODES 50

II.1. SYNTHESE 50

II.1.1. INDICATIONS GENERALES 50

II.1.2. SYNTHESE DES COMPOSES AMPHIPHILES PRESENTANT UN MOTIF PHENOL ENCOMBRE 51

II.1.2.1. Synthèse de l'acide-3-(3,5-di-ter-butyl-4-hydroxyphényl)-propionique 51

II.1.2.2. Estérification de l'acide-3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxy-phényl)-propionique 52

a) Synthèse des monoesters de PEG 52

b) Synthèse des diesters de PEG 53

II.1.3. SYNTHESE DES COMPOSES AMPHIPHILES A PARTIR DE L'ACIDE ASCORBIQUE 59

II.1.3.1. Réaction de l'acide ascorbique et d'une amine grasse (AaCn) 59

II.1.3.2. Synthèse de tensioactifs bimodulaires dérivés d'acide gras (AaEdCn) 63

a) Monotritylation de l'éthylène diamine 63

b) Couplage de l'éthylène diamine monotritylée avec un acide gras 64

II.1.4. SYNTHESE DES COMPOSES AMPHIPHILES PRESENTANT UN MOTIF AMINE ENCOMBREE 70

II.1.4.1. Réaction de l'anhydride succinique avec le 1,2,2,6,6-pentaméthyl-pipéridin-4-ol 70

II.1.4.2. Réactions des amines grasses avec le composé 9 71

II.2. PHYSICOCHIMIE 74

II.2.1. DETERMINATION DES PROPRIETES DE SURFACE D'UN TENSIOACTIF 74

II.2.1.1. Généralités et principe de la tensiométrie 74

II.2.1.2. Détermination de la tension de surface et de la concentration agrégative critique . 75

II.2.1.3. Mesure de la tension superficielle et conditions expérimentales 79

II.2.1.4. Mesure de la solubilité des produits de synthèse 79

II.2.2. CARACTERISATION DES PROPRIETES ANTIOXYDANTES 80

II.2.2.1. Méthode expérimentale utilisant l'oxydation du linoléate de méthyle 80

a) Principe 80

b) Conditions expérimentales de la mesure du pouvoir antioxydant en utilisant la méthode au linoléate de méthyle 82

II.2.2.2. Méthode utilisant le DPPH 82

a) Principe 82

b) Conditions expérimentales de la mesure du pouvoir antioxydant en utilisant la méthode au DPPH 84

II.3. ESSAIS BIOLOGIQUES 85

II.3.1. MATERIEL 85

II.3.2. IMPREGNATION DES EPROUVETTES 85

II.3.3. ESSAI BIOLOGIQUES SUR EPROUVETTES DE BOIS 85

II.3.3.1. Préparation du milieu 85

II.3.3.2. Confrontation des éprouvettes au champignon 86

II.3.4. ESSAI D'INHIBITION DE CROISSANCE SUR MILIEU GELOSE 86

II.3.5. ESSAI SUR PAPIER FILTRE 87

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS 8

III.1. ESSAIS PRELIMINAIRES METTANT EN EVIDENCE LES EFFETS DE SYNERGIE ENTRE BIOCIDE ET ANTIOXYDANT 8

III.1.1. DETERMINATION DES SEUILS D'ACTIVITE DE CHAQUE COMPOSE 8

III.1.1.1. Cas du Tinuvin770 9

III.1.1.2. Cas de l'Irganox 1076 9

III.1.1.3. Cas du Propiconazole 10

III.1.2. EFFETS DE SYNERGIE 11

III.2. SYNTHESE ET EVALUATION DE NOUVEAUX TENSIOACTIFS NON IONIQUES INCLUANT UN MOTIF PHENOL ENCOMBRE 12

III.2.1. INTRODUCTION 12

III.2.2. SYNTHESE 14

III.2.3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES 17

III.2.3.1. Comportement en solution aqueuse : propriétés de surface 17

III.2.3.2. Propriétés antioxydantes 20

III.2.4. PROPRIETES BIOLOGIQUES 23

III.3. SYNTHESE ET EVALUATION DE NOUVEAUX TENSIOACTIFS INCLUANT UN MOTIF ACIDE ASCORBIQUE 25

III.3.1. SYNTHESE 26

III.3.1.1. Réaction entre l'acide ascorbique et une amine grasse : « dérivés d'amines grasses de type AaCn » 26

III.3.1.2. Réaction entre l'acide ascorbique et un composé dérivé de l'éthylène diamine et d'un acide gras : « dérivés bimodulaires d'acides gras de type AaEdCn » 29

III.3.2. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES 32

III.3.2.1. Comportement dans l'eau : propriétés de surface 32

a) Dérivés amphiphiles d'amines grasses 32

b) Dérivés bimodulaires d'acides gras de type AaEdCn 35

III.3.2.2. Propriétés antioxydantes 36

a) Ascorbate de n-alkyl ammonium (AaCn) 36

b) Dérivés bimodulaires d'acides gras (AaEdCn).....41
III.3.3. ESSAIS BIOLOGIQUES IMPLIQUANT LES ASCORBATES DE N-ALKYLAMMONIUM (AACN) : TEST D'INHIBITION DE CROISSANCE.....43
III.3.3.1. Test d'inhibition de croissance sur disques de cellulose 43
III.3.3.2. Test d'inhibition de croissance sur milieu malt/agar 44
a) Effet de la structure des sels d'ascorbates sur les propriétés biologiques.....46
b) Effet de chaque constituants du sel d'AaC12 pris séparément 47
c) Effet du contre ion associé à l'ammonium de dodécylamine.....49
d) Effet de la longueur de la chaîne alkyle 50
e) Comparaison avec le DDAC.....52
III.3.3.3. APPLICATION DE L'ASCORBATE DE DODECYLAMMONIUM A LA FORMULATION DE PRODUITS DE PRESERVATION DU BOIS 53
III.4. SYNTHESE ET EVALUATION DE NOUVEAUX TENSIOACTIFS INCLUANT UN MOTIF AMINE ENCOMBREE.....59
III.4.1. SYNTHESE.....59
III.4.2. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES.....62
III.4.2.1. Comportement dans l'eau : propriétés de surface.....62
III.4.2.2. Propriétés antioxydantes 64

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....148

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....151

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'étude décrite dans ce manuscrit concerne la synthèse, la caractérisation des propriétés physico-chimiques et biologiques de nouveaux tensioactifs présentant des propriétés antioxydantes utilisables pour la formulation de produits de préservation du bois. En effet, le bois est un matériau très utilisé depuis toujours dans notre société du fait de sa disponibilité, de ses qualités esthétiques et sa facilité de mise en œuvre. Cependant, malgré ces nombreux avantages, le bois souffre d'un inconvénient majeur lié à sa susceptibilité aux agents de dégradation abiotiques (humidité, lumière, oxygène, chaleur…) et biotiques (champignons, insectes, bactéries). Il est donc nécessaire d'avoir recours à des produits de préservation pour le protéger et permettre une utilisation pérenne.

Différents produits ont été proposés et utilisés depuis la fin du XVIIIème siècle pour protéger le bois. Parmi ceux-ci, peuvent être cités, le pentachlorophénol, la créosote (goudrons d'origine diverse) ou encore les formulations multi-sels à base de cuivre, de chrome et d'arsenic (CCA) (Lebow *et al.*, 1994,1996 ; Pizzi *et al.*, 1984, 2004). Bien que très efficaces, tous ces composés présentent l'inconvénient d'être toxiques pour l'environnement et ont été de ce fait, soit totalement interdits, soit fortement réglementés, limitant ainsi leurs applications (Tanjore et Viraragnavan, 1997 ; Kartal *et al.*, 2006). Les pressions environnementales de plus en plus importantes ont poussé les différents gouvernements européens à prendre des mesures pour protéger l'environnement (Palmer *et al.*, 2001 ; Kartal *et al.*, 2001, 2004, 2006). C'est ainsi que la directive biocide prévoit l'abandon de différents produits du fait de leur trop forte toxicité et que la loi sur l'air préconise l'emploi de traitement en solution aqueuse pour limiter tout rejet de composés organiques volatils (COV) (Kinzell *et al.*, 1981 ; Holley et Patel, 2005). De ce fait, les industriels développent des traitements alternatifs dits de « nouvelle génération », de types ACQ (Ammoniacal Copper Quat), CBA (Copper Boron Azole) (Simpson Strong-Tie, 2006).

Dans ce contexte, l'équipe de Chimie Organique et Microbiologie du LERMAB s'intéresse depuis plusieurs années à la mise au point de nouvelles solutions de préservation à faible impact environnemental, basées sur l'association de différents produits pouvant interférer sur les mécanismes biochimiques utilisés par les champignons pour dégrader le bois (Mabicka *et al.*, 2003). Une des pistes retenues consiste à associer des antioxydants à des biocides organiques insolubles dans l'eau. En effet, la dégradation du bois par les champignons de pourriture implique différents

systèmes enzymatiques ou hydrolytiques, parmi lesquels de nombreux systèmes d'oxydo-réduction. L'association de composés antioxydants aux formulations de fongicides permet d'envisager de perturber les mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois en renforçant l'efficacité du biocide et ainsi de mieux inhiber la dégradation des biopolymères constitutifs du matériau (Schultz et Nicholas, 2002 ; Burt *et al.,* 2004 ; Smith *et al.,* 2005).

Les produits organiques constituent une famille importante de produits employés pour la préservation du bois. Longtemps utilisés en phase organique, ces derniers sont de plus en plus utilisés en phase aqueuse pour limiter les rejets de composés organiques volatils dans l'atmosphère et se conformer ainsi aux dispositions de la loi sur l'air récemment mise en place par les autorités gouvernementales (Angermier's *et al.,* 1998). Le recours à différents tensioactifs et co-solvants est donc nécessaire pour solubiliser ces derniers dans l'eau et permettre la préparation de formulations sous forme d'émulsions ou de micro-émulsions (Bertwob *et al.,* 1983). Ceci a amené l'équipe de Chimie Organique et Microbiologie du LERMAB à envisager une collaboration avec l'équipe Synthèse et Assemblage de Composés Amphiphiles de l'UMR SRSMC, pour étudier et tester l'intérêt que pourraient présenter des composés amphiphiles originaux de type « deux en un » présentant, en plus de leurs propriétés tensioactives, des propriétés antioxydantes permettant à la fois de solubiliser le biocide organique mais aussi de renforcer son activité grâce à leurs propriétés antioxydantes.

C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la préparation de molécules amphiphiles présentant des motifs antioxydants. Différents types de motifs antioxydants ont été envisagés à ces fins. Ces derniers ont été sélectionnés du fait de leur importance dans le domaine de la stabilisation des polymères (Zweifel, 1997) :

- un motif 2,6-ditert-butyl-4-phénol qui est un inhibiteur de radicaux libres d'origine pétrochimique appartenant à la famille des phénols encombrés,

- l'acide ascorbique ou 5-(1,2-dihydroxyethyl)-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-one, plus connu sous le nom de vitamine C qui est un antioxydant d'origine naturelle très répandu dans le règne végétal (Smirnoff *et al.,* 1996 ; Asada *et al.,* 1994,1988),
- et enfin, un motif 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine qui est antioxydant de synthèse de type amine encombrée permettant d'inhiber les radicaux libres impliqués dans les réactions de dégradation des polymères (Step *et al.,* 1993).

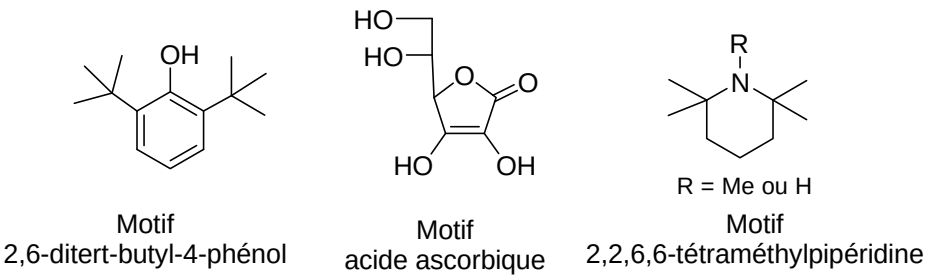


Figure 1. Différents motifs antioxydants envisagés

En fonction de la nature hydrophile ou hydrophobe de la partie antioxydante, nous avons envisagé le greffage d'un module complémentaire hydrophile ou hydrophobe pour conférer aux produits des propriétés amphiphiles. Dans chaque cas, nous nous sommes intéressés à la synthèse, à la caractérisation des propriétés physico-chimiques, telles que les propriétés tensioactives, antioxydantes, et à l'application de ces nouveaux composés pour la formulation de produits de préservation du bois.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. DEGRADATION DU BOIS

Le bois est un matériau très utilisé dans la construction qui connaît actuellement un regain d'intérêt du fait de son aptitude à stocker le CO_2 (Jodin, 1994). Cependant, son inconvénient majeur est lié à sa durée de vie limitée lorsqu'il est mis en œuvre dans des conditions extérieures d'utilisation. En effet, soumis à l'action de différents facteurs biotiques, tels que les micro-organismes et les insectes, ou abiotiques, tels que l'humidité, les variations de température, le rayonnement UV et la pollution, le bois va se dégrader progressivement, perdant son intégrité physique et son caractère esthétique (Bohle *et al.*, 1996 ; Branca et Di Blasi, 2003 ; Ros-Barcelo *et al.*, 2006). Ainsi, l'action de certains agents biologiques ou d'une température excessive va conduire à l'oxydation du matériau, entraînant une détérioration de son aspect physique et de ses propriétés mécaniques (Shanks *et al.*, 2003). Les champignons de pourriture qui utilisent le bois comme source de carbone sécrètent différents types d'enzymes extracellulaires capables d'oxyder et de dépolymériser les macromolécules constitutives des parois cellulaires du bois (Cullen et Kersten, 2004). Les phénomènes d'oxydation sont également impliqués dans les problèmes de changement de couleur et de grisaillement consécutifs à une exposition prolongée à la lumière (Schaller et Rogez, 2007). Etant donné l'importance des réactions d'oxydation dans les phénomènes de dégradation du bois, différents auteurs ont suggéré d'utiliser des antioxydants pour protéger le matériau. Les paragraphes qui vont suivre sont destinés à présenter la composition chimique du bois et les agents biotiques et abiotiques responsables de la dégradation du matériau par oxydation.

I.1.1. RAPPEL SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DU BOIS

La composition chimique du bois est complexe. Une première distinction peut être faite entre les composants macromoléculaires des parois cellulaires (cellulose, hémicelluloses et lignine) constituant l'essentiel du matériau et les composants de faible poids moléculaire, tels que les substances minérales et les extractibles généralement présents en faibles quantités. Les proportions et la composition chimique de la lignine et des polyoses diffèrent suivant les types de bois et, tout particulièrement, selon la nature de l'essence (feuillus ou résineux) (Han *et al.*, 1991). Ces polymères

végétaux ne sont pas distribués uniformément au sein des parois cellulaires. De plus, leurs proportions varient en fonction de la localisation dans le bois. Le taux de cellulose est généralement de l'ordre de 40 à 45 %, celui des hémicelluloses compris entre 15 et 25 % et celui de la lignine compris entre 15 et 25 %, les feuillus étant souvent plus riches en lignine que les résineux (Rowell *et al.*, 2005). Les proportions des différents constituants macromoléculaires peuvent varier légèrement selon l'essence envisagée. Il existe également des substances extractibles présentes en quantités plus ou moins importantes (2 à 10 % en moyenne pour les essences des zones tempérées). Ces extractibles peuvent être de nature chimique très variée et comprennent les cires, les graisses, les terpènes et les composés phénoliques, ces derniers se divisant eux-mêmes en différentes catégories : les phénols simples, les lignanes, les flavonoïdes et les tannins. En plus de ces extractibles de nature organique, il existe également des extractibles d'origine minérale, dont la quantité dépasse rarement 1 % chez les essences des zones tempérées. Les essences des zones tropicales renferment généralement des teneurs en extractibles (organiques et minéraux) plus élevées.

I.1.1.1. La cellulose

La cellulose constitue la structure de base des parois cellulaires des cellules végétales. C'est la substance naturelle la plus abondante produite par les organismes vivants sur terre avec une quantité estimée d'environ 40 % du carbone organique. La production mondiale de cellulose est estimée autour de $1{,}3.10^{10}$ tonne par an. La cellulose, de formule générale $(C_6H_{10}O_5)_n$, correspond à un polymère linéaire constitué d'unités β-D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons β-1,4 glycosidique (Figure 2).

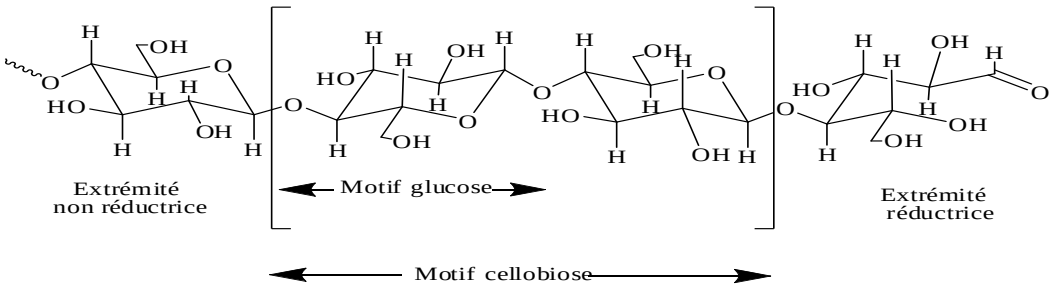


Figure 2. La structure de la cellulose

Elle présente une extrémité réductrice et une extrémité non réductrice. Les fonctions aldéhydiques ainsi que les fonctions hydroxyles peuvent être sensibles à certains agents d'oxydation. Son degré de polymérisation moyen est compris entre 7000 et 15000 (Fengel et Wegener, 1984). Elle est associée aux hémicelluloses et à la lignine (décrites dans les paragraphes suivants) dans les parois cellulaires.

L'ensemble constitué de la cellulose et des hémicelluloses est appelé holocellulose. Elle joue un rôle primordial dans le comportement mécanique des parois cellulaires du bois. Dans son état naturel, la cellulose est en partie amorphe et en partie cristalline. Du fait de sa constitution chimique, elle peut établir des liaisons de faible énergie, telles que des liaisons hydrogènes. Les liaisons hydrogène sont responsables de la formation des microfibrilles dans lesquelles certaines régions sont hautement ordonnées (régions cristallines) et d'autres moins (régions amorphes) (Figure 3).

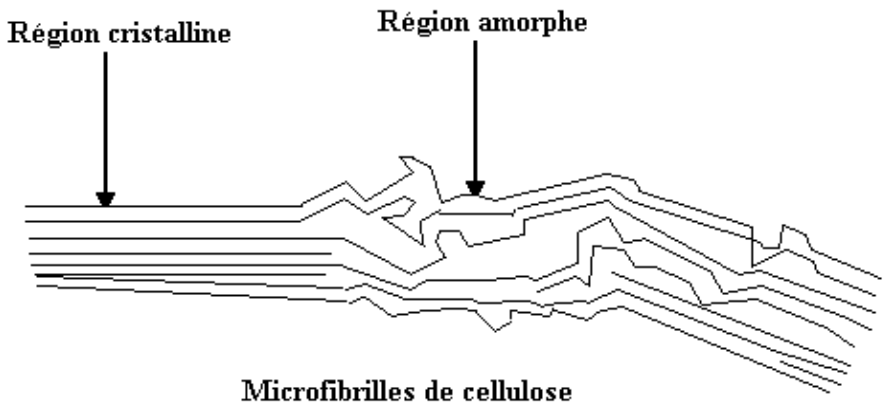


Figure 3. Représentation schématique des zones cristallines et amorphes de la cellulose

I.1.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont définies comme étant des hétéropolysaccharides non cellulosiques présents dans les parois cellulaires des végétaux. Ces macromolécules polyosidiques présentent une grande diversité structurale (Fengel et Wegener, 1984). Elles constituent une matrice amorphe venant enrober la cellulose au niveau des couches cellulaires. Tout comme la lignine, elles sont intimement associées à la cellulose au niveau des parois. Les chaînes des hémicelluloses présentent un degré de polymérisation plus faible que celui de la cellulose d'environ 150 unités et sont, au contraire de la cellulose, ramifiées. Elles sont constituées d'unités osidiques différentes réparties de façon plus ou moins aléatoire. La nature des unités osidiques constitutives des hémicelluloses varie selon les essences.

Les hémicelluloses présentes dans les bois des feuillus de zones tempérées, sont principalement constituées de glucuronoxylanes (15 à 30 %) et dans des proportions moins importantes (2 à 5 %) de glucomannanes (Fengel et Wegner, 1984 ; Jodin, 1994). La chaîne principale des glucuronoxylanes est constituée d'unités xylose partiellement acétylées liées par des liaisons β-(1,4), sur laquelle viennent se greffer des résidus d'acide 4-O-methyletherglucuronique liés par des liaisons α-(1,2). Les glucomannanes sont formés de D-glucose liés à du D-mannose par

une liaison β-(1,4) et ne sont pas acétylés. Les hémicelluloses des bois de résineux sont principalement constituées de galactoglucomannanes (20 à 25 %) et d'arabinoglucuronoxylanes (5 à 10 %). Les galactoglucomannanes sont partiellement acétylés. La chaîne principale est constituée de mannose et de glucose liés par des liaisons β-(1,4) auxquelles sont liés du galactose par des liaisons α-(1,6) (Fengel et Wegener, 1984 ; Esker *et al.*, 2004).

La structure des différentes unités osidiques présentes dans les hémicelluloses est rapportée dans la Figure 4.

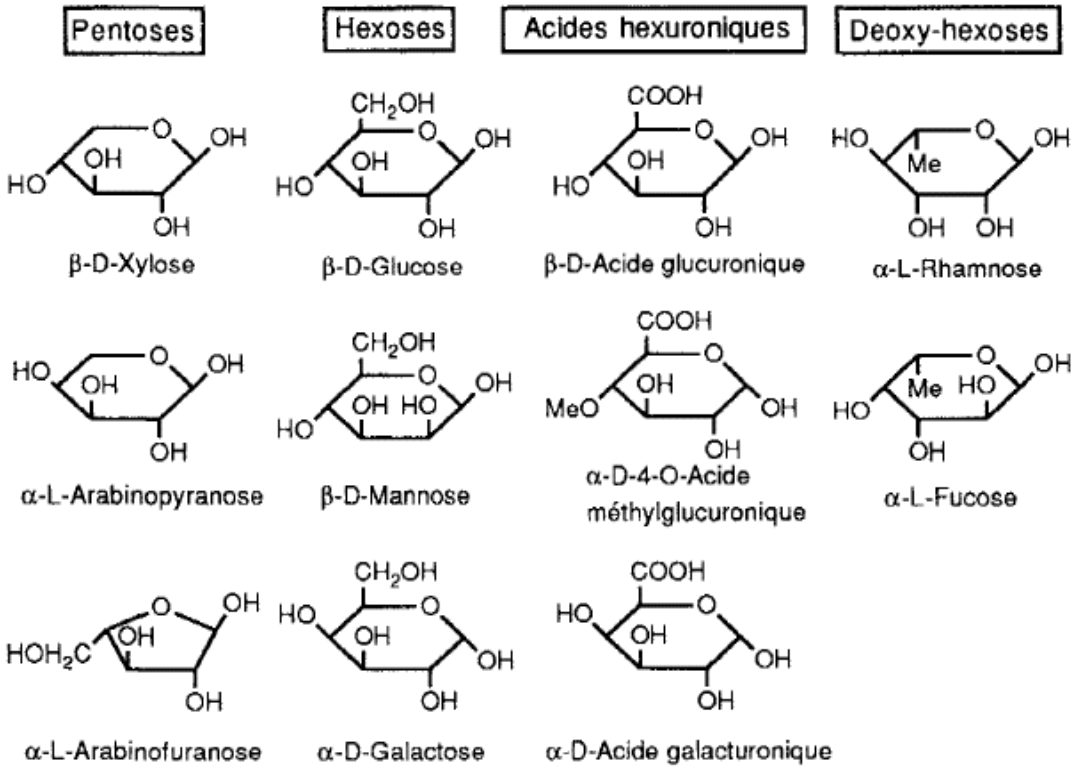


Figure 4. Unités osidiques composant les hémicelluloses

I.1.1.3. La lignine

La lignine constitue la fraction non saccharidique la plus importante des fibres végétales. C'est un polymère polyphénolique tridimensionnel synthétisé par la plante à partir de trois précurseurs de type phénylpropane constitués des alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylique (Figure 5).

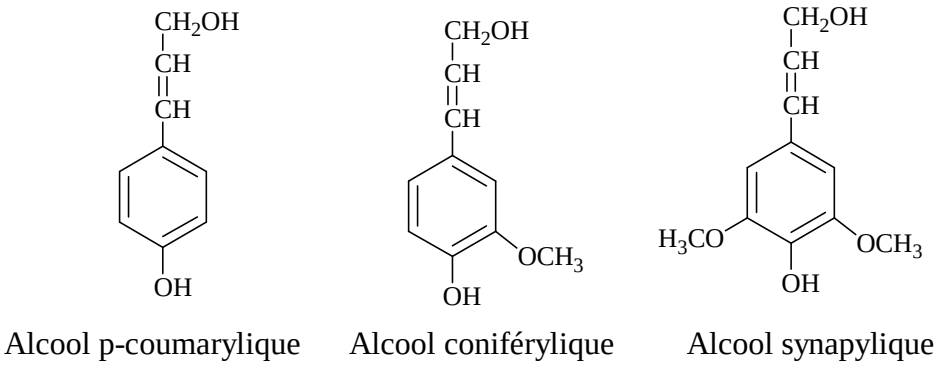


Figure 5. Précurseurs de la lignine

Contrairement à la cellulose qui présente une structure régulière, la lignine présente une structure très complexe. Sa composition est différente suivant les espèces végétales. La composition varie également à l'intérieur d'une même essence, selon qu'il s'agit de bois normal ou de bois de réaction. La composition et la teneur en lignine varient également au niveau pariétal en fonction de la localisation dans la paroi cellulaire. La lamelle mitoyenne est généralement plus riche en lignine. La lignine des résineux est biosynthétisée principalement à partir d'unités alcool coniférylique encore appelées unités guaïacyl. Par contre, la lignine des feuillus comprend des proportions équivalentes d'alcool coniférylique et synapylique, constituant respectivement les unités guaïacyl et syringyl. L'alcool p-coumarylique est présent en faible quantité chez les feuillus comme les résineux. La biosynthèse de la lignine implique des réactions de couplage oxydant s'effectuant à partir de radicaux phénoxy très délocalisés (Figure 6). Ces radicaux phénoxy vont ensuite se coupler de façon aléatoire pour conduire à la formation de la lignine (Alder, 1977).

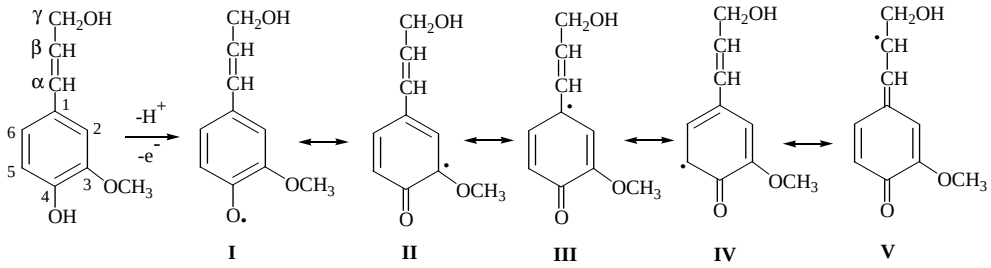


Figure 6. Radicaux phénoxy impliqués dans la biosynthèse de la lignine

Cette réactivité des groupements phénoliques de la lignine avec les espèces radicalaires va également être impliquée dans sa dégradation au niveau du bois. La Figure 7 représente, à titre indicatif la structure possible de la lignine d'épicéa proposé par Alder en 1977 mettant en évidence la complexité de sa structure.

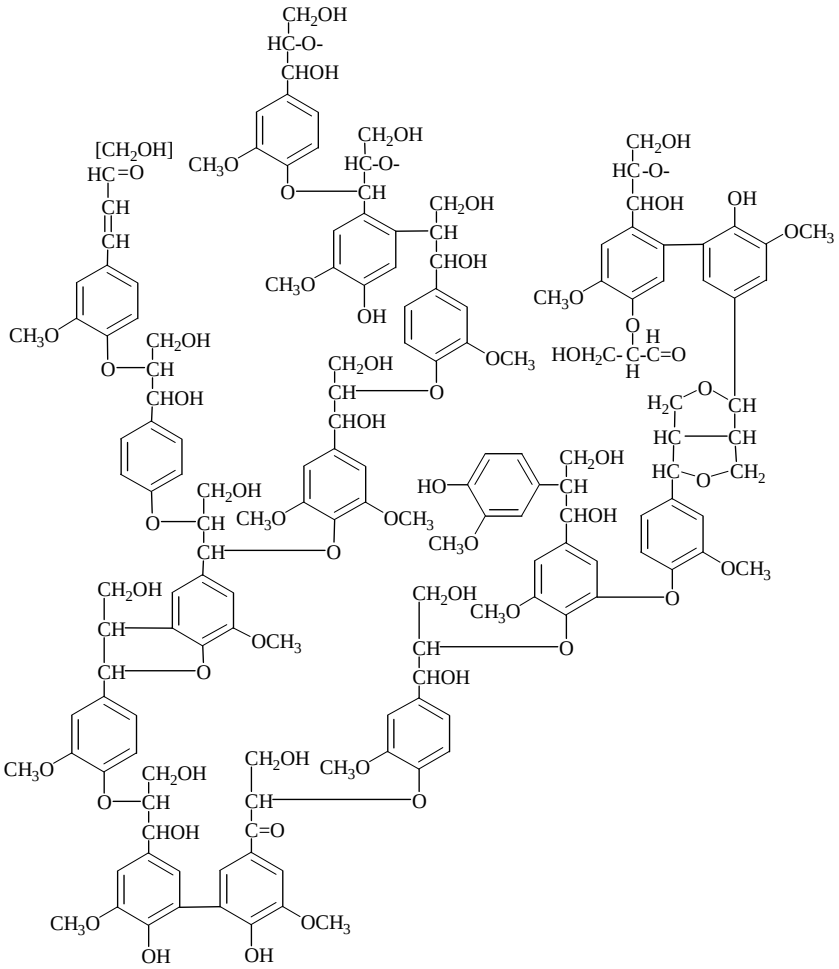


Figure 7. Modèle de la structure de la lignine d'épicéa proposée par Alder (1977)

La lignine peut également être liée aux hémicelluloses par l'intermédiaire de liaisons covalentes (Figure 8).

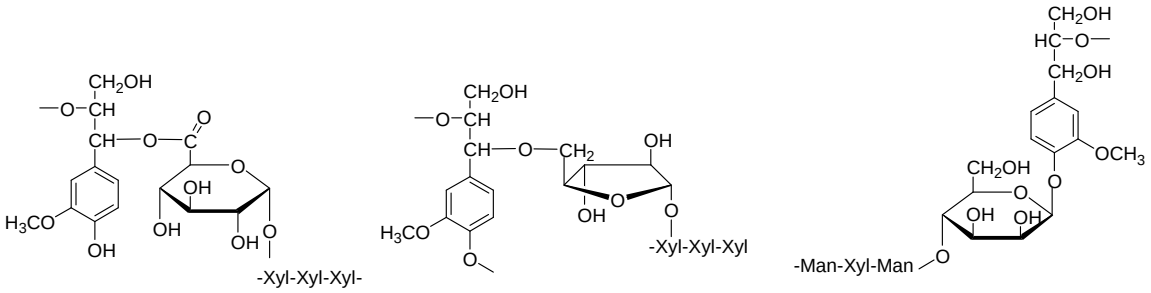


Figure 8. Différents types de liaisons de la lignine avec les hémicelluloses

I.1.2. LES AGENTS RESPONSABLES DE LA DEGRADATION DU BOIS PAR OXYDATION

L'oxydation des biopolymères est le premier facteur en cause dans la dégradation de la matière organique (Tanaka *et al.,* 1985). Lorsque le bois est utilisé dans des conditions extérieures, exposé à la lumière et aux variations climatiques, il est sujet à de nombreuses réactions d'oxydation qui peuvent être de nature photochimique dans le cas de l'exposition à la lumière solaire ou biochimique dans le cas des agents de pourriture.

I.1.2.1. Les facteurs abiotiques : effet du rayonnement UV

Le bois utilisé pour la construction et certaines applications décoratives, est soumis à l'influence du rayonnement solaire et de l'oxygène de l'air ambiant qui va être à l'origine de phénomènes de dégradation de surface du matériau. De nombreuses études réalisées sur le pin (*pinus radiata*) ont montré que les ultra-violets émis par le rayonnement solaire, les variations de températures ainsi que l'oxygène étaient la cause de modifications chimiques occasionnant des faiblesses mécaniques du matériau (Schaller et Rogez, 2007). Dans ce contexte la connaissance des effets de la lumière et de l'oxygène sur la chimie de surface du bois est cruciale pour pouvoir proposer des solutions permettant de protéger le bois de la photo-dégradation.

La photo-oxydation du bois occasionnée par la lumière solaire est un phénomène qui se produit assez rapidement en surface, conduisant à un changement de couleur du matériau exposé (Ferm, 1972 ; Feist et Hon, 1984). Le changement de coloration peut se produire avec les bois placés aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur et, plus particulièrement, dans le cas d'espèces de bois clairs qui tendent à jaunir et s'assombrir en réponse à la photo-oxydation de surface. Ce phénomène a été attribué à un ensemble de réactions induites par un certain nombre d'agents abiotiques comme le rayonnement solaire (UV et visible), l'humidité, la température et l'oxygène. Ainsi, l'action de ces différents agents environnementaux va conduire à une série de réactions radicalaires en chaîne appelée photo-dégradation qui se traduit par une décoloration du matériau.

La photo-oxydation de la lignine va générer des ruptures de liaisons conduisant à la dépolymérisation de cette dernière. L'abstraction d'atome d'hydrogène a pour conséquence la formation de radicaux qui, en présence d'oxygène, va conduire à la formation d'hydroperoxydes et de peroxydes impliqués dans la décomposition du polymère et la production de sous-produits colorés appelés chromophores. La structure aromatique de la lignine, présentant des systèmes fortement

conjugués, va être à l'origine de la sensibilité de cette dernière à la photo-dégradation, alors que les constituants polysaccharidiques seront nettement moins sensibles à la lumière (Herrick *et al.*, 1975 ; Barker *et al.*, 1980 ; Agarwal et Atalla, 1993). Les modifications causées par la photo-oxydation du bois induisent des changements de propriétés de surface se traduisant par une décoloration et par l'apparition de micro-fissures puis de fissures. Le bois devient également plus sensible vis-à-vis de l'humidité et du lessivage, sa surface devenant plus hydrophile (Hon, 1991). Les mécanismes de la photo-oxydation de la lignine ont été abondamment étudiés (Kringstad et Lin, 1972 ; Gierer et Lin, 1972 ; Scaiano *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1993 ; Heitner, 1993 ; Jones, 1994 ; Gierer *et al.*, 1994 ; Schmidt et Heitner, 1995).

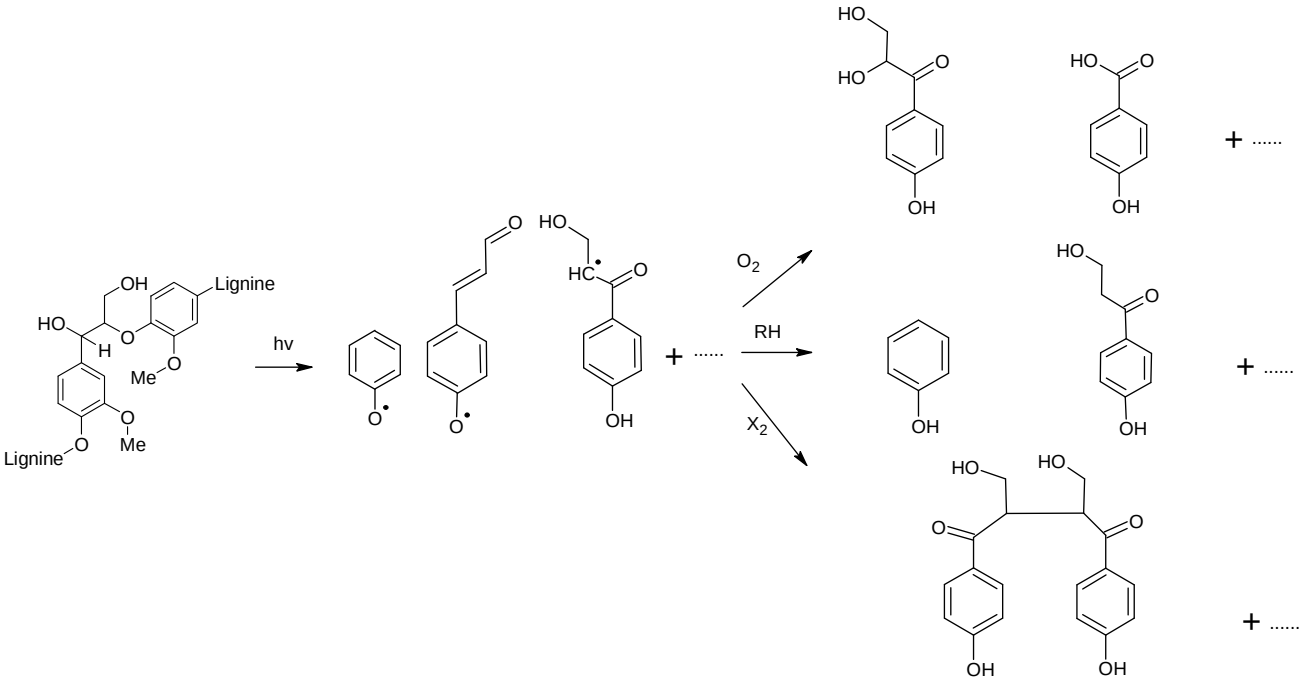


Figure 9. Exemple de mécanisme de photo-oxydation de la lignine

Dans le cadre d'une étude sur le jaunissement de pâtes thermomécaniques, Schmidt et Heitner (1995) ont rapporté différentes réactions radicalaires conduisant à des ruptures de liaisons et à la formation de chromophores colorés. Plusieurs processus réactionnels sont impliqués dans ces réactions. L'abstraction d'un hydrogène benzylique d'un groupe α-guaiacylglycérol-β-aryléther forme un radical cétyle qui subit alors une rupture de la liaison β-O-4-aryléther pour produire un énol et un radical phénoxyl. L'énol conduit par tautomérie à la forme cétonique correspondante, alors que le radical phénoxyl va être oxydé en ortho-quinone (Figure 10).

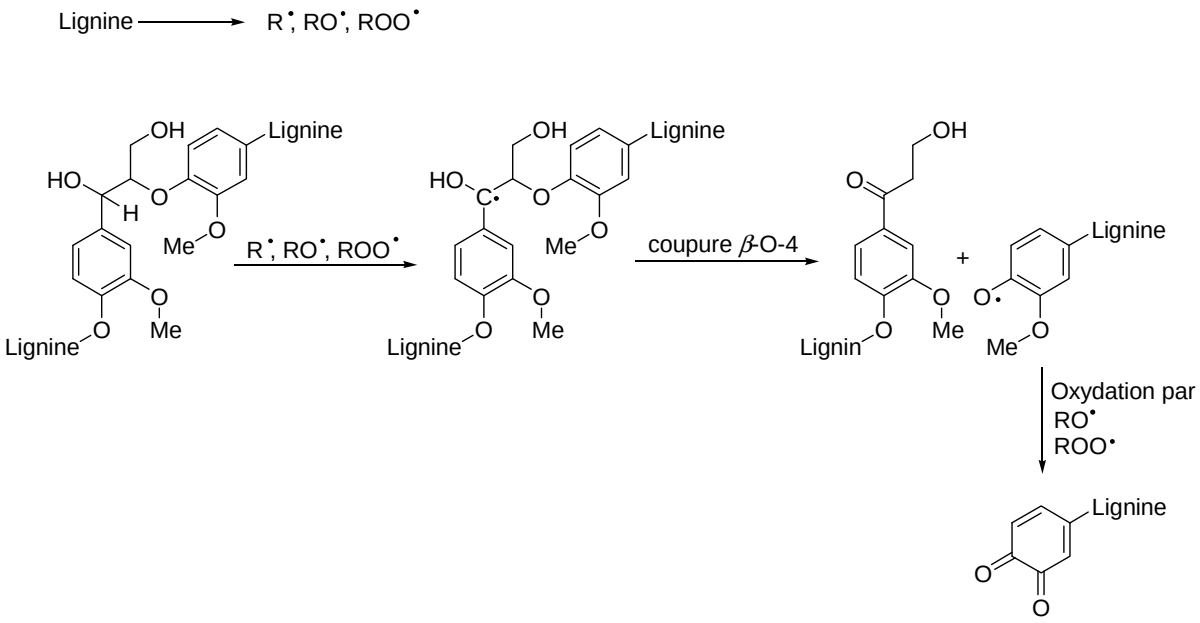


Figure 10. Réactions d'oxydation impliquées dans le jaunissement de la pâte thermomécanique

Une étude menée par Crestini et D'Auria en 1997 a mis en évidence le rôle possible de l'oxygène singulet sur la dégradation de modèles de lignine. Dans cette étude, les auteurs ont montré que la rupture de la liaison β-O-4-aryléther pouvait être considérée comme une étape primaire photochimique indépendante de la présence d'un groupement carbonyle en α. L'oxygène singulet formé en présence de rose Bengal comme sensibilisateur peut ainsi réagir avec l'éther aromatique de différents modèles de lignine utilisés pour conduire à différents produits de dégradation.

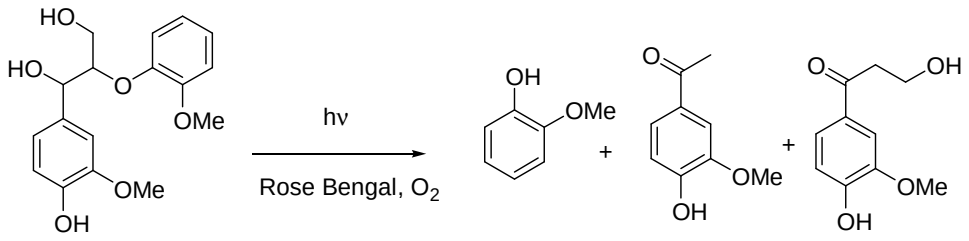


Figure 11. Oxydation par l'oxygène singulet

I.1.2.2. Les facteurs biotiques : effet des agents de pourriture

Différents agents biotiques sont susceptibles de dégrader le bois. Parmi ceux-ci, sont recensés les insectes, tels que les termites, les capricornes ou les vrillettes et de nombreux micro-organismes appartenant à la famille des bactéries ou des champignons. Nous limiterons notre bibliographie aux

champignons de pourritures qui sont responsables d'une part importante de la dégradation du bois et qui impliquent de nombreux processus d'oxydation. Les champignons de pourriture jouent un rôle primordial au niveau de la dégradation du bois en forêt permettant ainsi la régénération des sols. Par contre, lorsque ces derniers s'attaquent au bois mis en œuvre, il devient impératif de traiter ce dernier pour protéger l'intégrité de la construction. Les champignons sont classés en différentes catégories en fonction des dégâts qu'ils occasionnent au matériau. Ainsi sont distingués :

- les champignons de pourriture blanche, encore appelés champignons de pourriture fibreuse, causant d'importantes dégradations au matériau en s'attaquant à la lignine et aux polysaccharides ;
- les champignons de pourriture brune, encore appelés champignons de pourriture cubique, qui s'attaquent principalement aux polysaccharides du bois ;
- les champignons de pourriture molle qui s'attaquent également aux polysaccharides du bois et dans une moindre mesure à la lignine ;
- les champignons de bleuissement qui s'attaquent uniquement aux résidus nutritifs présents dans l'aubier provoquant ainsi des colorations bleuâtres inesthétiques sans occasionner de dégradations notoires aux constituants macromoléculaires du bois ;
- et les moisissures qui se développent principalement en surface sans affecter l'intégrité physique du matériau et qui peuvent être facilement éliminées par brossage.

Les processus impliqués dans la dégradation du bois sont généralement complexes et diffèrent en fonction du type de champignon. Notamment, sont distingués des mécanismes de dégradation par voies enzymatiques et d'autres par voies non-enzymatiques. Bien que les mécanismes biochimiques impliqués dans la dégradation oxydante du bois ne soient pas totalement élucidés, bon nombre d'auteurs s'accordent sur l'importance du rôle joué par les peroxydases, telles que les lignine et les manganèse peroxydases, par les oxydases comme les laccases, et par les espèces oxygénées actives (Active Oxygen Species, AOS), tels que l'anion superoxyde radicalaire ($O_2^{\cdot -}$), l'eau oxygénée (H_2O_2) et particulièrement les radicaux hydroxyle ($HO^{\cdot}$) générés par différentes réactions comme la réaction de Fenton (Hammel, 1997; Kerem *et al.*, 1999 ; Ruda et Dutta, 2005).

a) Les peroxydases

Les peroxydases sont des enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation et la dépolymérisation de la lignine. Constituées d'un site actif contenant soit du fer soit du manganèse, ces enzymes sont responsables de la génération d'espèces radicalaires hautement réactives qui vont être les principaux médiateurs de la dégradation de la lignine (Cullen et Kersten, 2004). Leurs modes

d'action répondent à un mécanisme catalytique de type « ping-pong » conduisant à la formation d'espèces radicalaires capables de diffuser dans la paroi cellulaire et d'aller oxyder la lignine à distance. On distingue deux grandes familles de peroxydases : les Lignine peroxydases (LiP) et les Manganèse peroxydases (MnP). Ces deux enzymes sont des métalloprotéines complexes (Figure 12) qui vont fonctionner à l'aide d'eau oxygénée. La taille de ces enzymes et l'encombrement du site actif ne permettent pas à ces dernières d'oxyder directement la lignine des parois cellulaires et impliquent l'oxydation préalable de substrats de plus petite taille allant par la suite oxyder la lignine.

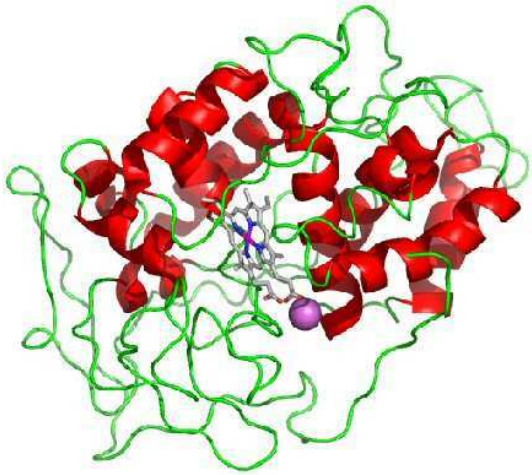


Figure 12. Structure d'une Manganèse Peroxydase isolée à partir de *P. chrysosporiium* (chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood4.html.)

Le peroxyde d'hydrogène oxyde l'atome de fer III du noyau hème de l'enzyme selon un mécanisme entraînant un transfert de deux électrons permettant la formation du composé I contenant un centre oxyferrique dans lequel le fer présente un degré d'oxydation IV et un cation porphyrique radicalaire. Le composé I oxyde à son tour une molécule de substrat par transfert d'un électron conduisant à la formation du composé II, qui va à son tour oxyder une deuxième molécule de substrat permettant le retour de l'enzyme à son état initial (Figure 13) (Wesenberg *et al*., 2003).

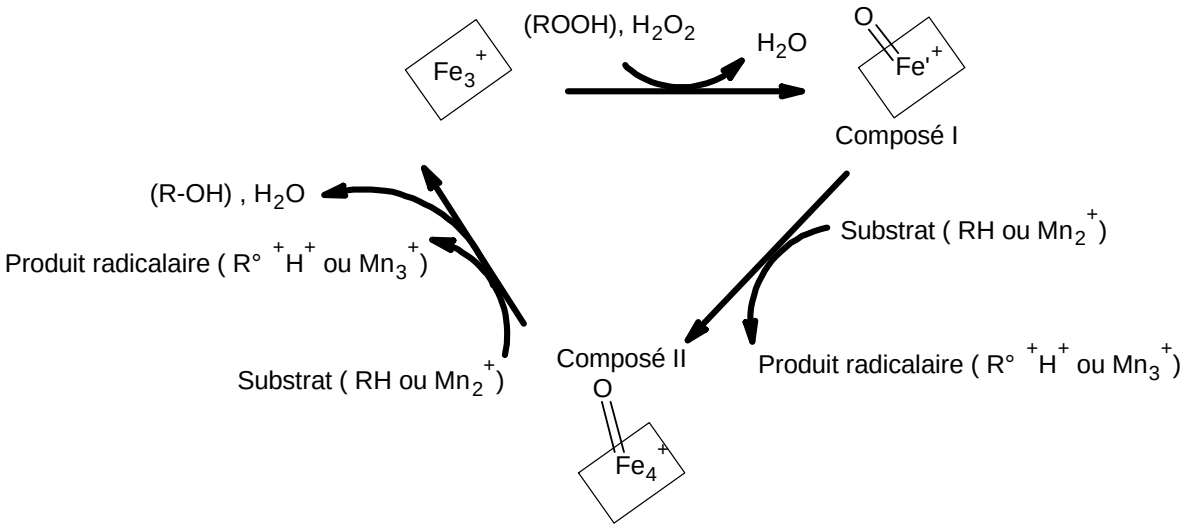


Figure 13. Cycles catalytiques impliqués dans le fonctionnement des peroxydases

Les lignines peroxydases (Lip)

Les lignines peroxydases sont capables de dégrader une grande variété de substrats aromatiques tels que les phénols, les éthers aromatiques, ainsi qu'une grande variété de substrats non phénoliques. Trop volumineuses pour pénétrer à l'intérieur des parois cellulaires, les lignines peroxydases peuvent s'attaquer soit à la lignine présente à la surface de la paroi secondaire, soit à celle contenue à l'intérieur des parois cellulaires au moyen de substances de faible poids moléculaire capables de pénétrer dans les parois cellulaires et de les oxyder de l'intérieur (Haemmerli *et al.*, 1987). Ces substances, encore appelées médiateurs chimiques, sont issues du métabolisme secondaire du champignon et produites par des enzymes telles que la vératryl alcool oxydase et la glyoxal oxydase (Breen *et al.*, 1999). Le cycle catalytique est présenté dans la Figure 14.

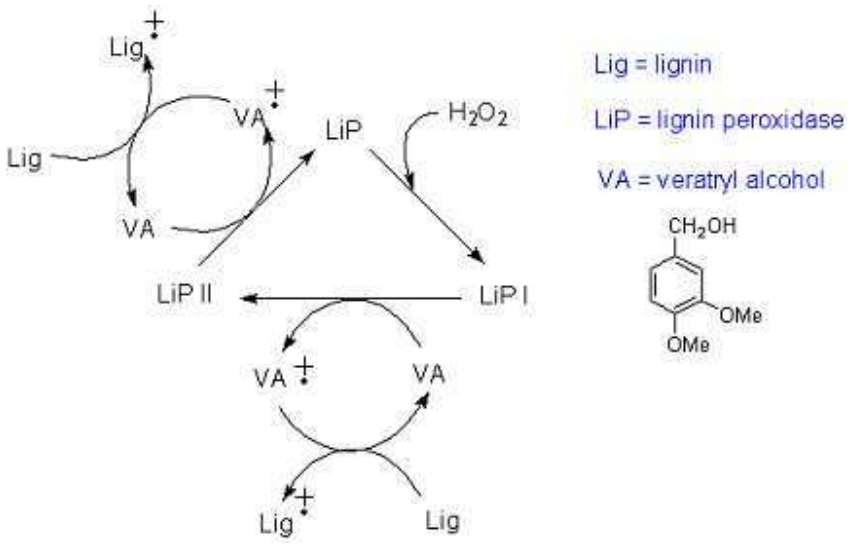


Figure 14. Rôle de l'alcool vératrylique dans le fonctionnement des LiPs

Les LiPs dégradent la lignine en différents sous produits qui pourront alors être transformés par d'autres agents oxydants, entraînant ainsi la formation de composés de faibles masses moléculaires facilement assimilables par les microorganiques (Figure 15).

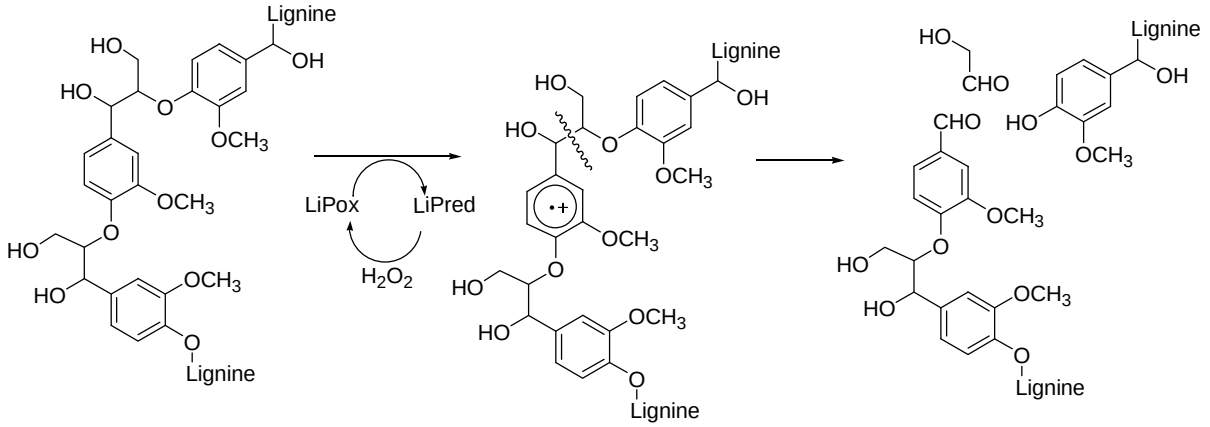


Figure 15. Exemples de réactions impliquées dans la dépolymérisation de la lignine par les LiPs

Les manganèses peroxydases (MnPs)

Les manganèses peroxydases sont des enzymes moins agressives que les précédentes. Elles s'attaquent uniquement aux substrats phénoliques présents dans la lignine, soit environ seulement 10% de cette dernière. Elles nécessitent la présence de manganèse II pour fonctionner, impliquant un

transfert monoélectronique de ce dernier vers l'enzyme permettant sa réduction (Goodell *et al.*, 1985). Le Manganèse III alors formé est stabilisé par différents chélateurs organiques comme l'oxalate ou le glycolate (Shimada *et al*., 1997). Ces complexes peuvent alors diffuser dans le bois et permettre une oxydation à distance des substrats phénoliques. Le modèle probable d'action des MnP est schématisé dans la Figure 16. Tout comme pour les LiPs, les produits de dépolymérisation de la lignine vont être à leur tour dégradés par différents systèmes oxydants.

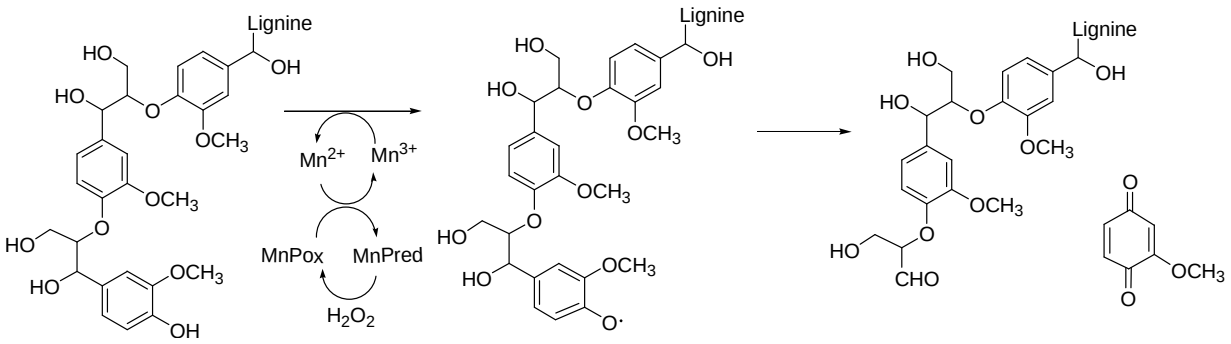


Figure 16. Exemples de réactions impliquées dans la dépolymérisation de la lignine par les MnPs

b) Les laccases

Les laccases correspondent au type d'enzyme le plus fréquemment rencontré appartenant à la famille des phénols oxydases, aussi bien dans les plantes supérieures que dans les champignons. Ces enzymes à cuivre catalysent l'oxydation des composés phénoliques présents dans la lignine en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons (Law *et al.,* 1996 ; Saparrat Mario *et al.,* 2002 ; Rodriguez *et al.,* 2004). Les laccases sont des glycoprotéines renfermant quatre atomes de cuivre disposés sur des sites différents. Elles font partie des enzymes de dégradation des substances phénoliques de faibles masses moléculaires, dont les extractibles agissant par l'intermédiaire d'espèces radicalaires (Hirano *et al.,* 1997). Elles interviennent, en présence d'oxygène, dans la dégradation des composés aromatiques (méthoxyphenols, hydroquinones…), ainsi que dans celle des acides et aldéhydes résultants de la première étape de dégradation de la lignine par les lignines peroxydases. Elles appartiennent au groupe des « blue multicopper oxidase » (Shah et Nerud, 2002) possédant dans leur site actif quatre atomes de cuivre, un de type 1, isolé, responsable de l'oxydation des phénols et trois autres atomes de cuivre dont 1 de type 2 et 2 de type 3, qui sont responsables de l'activation du dioxygène (Figure 17) (Wesenberg *et al*., 2003).

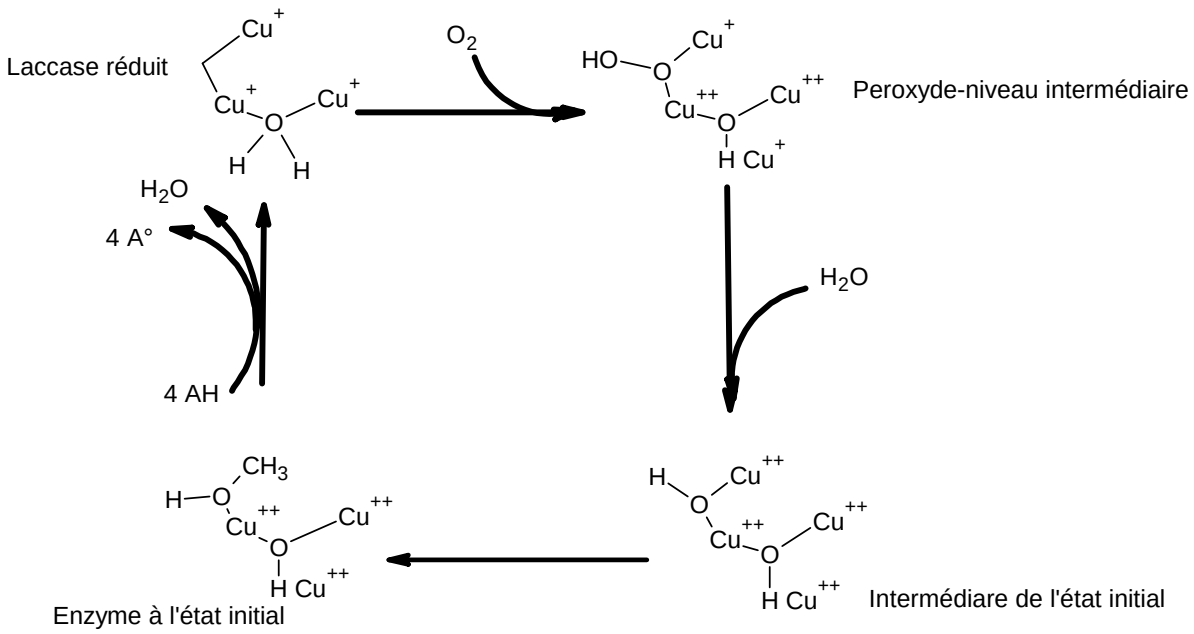


Figure 17. Mécanisme catalytique des laccases

Beaucoup de champignons de pourritures blanches produisent des laccases, mais leur rôle n'est encore pas à ce jour totalement élucidé (Ardon *et al*., 1998). Impliquées dans la dégradation de la lignine, elles interviennent dans des réactions d'oxydation mono-électroniques conduisant à la formation de cations radicaux par abstraction d'un électron au noyau aromatique. Ces intermédiaires instables subissent soit une seconde oxydation enzymatique, soit différentes réactions non enzymatiques telles que des réactions d'hydratation ou de disproportionnation. Durant l'oxydation de composés phénoliques tels que celles des hydroquinones en quinones, il a été rapporté que l'oxygène conduisait à la formation d'un radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$ provoquant la formation d'eau oxygénée impliquée dans différentes réactions d'oxydations non enzymatiques telles que les réactions de Fenton ou d'Haber Weiss. Ainsi, il a été mis en évidence la production de radicaux hydroxyles, de dérivés d'hydroquinones et d'ions ferriques chélatés dans un mélange réactionnel contenant la laccase *Pleurotus oryngii* (Guillen *et al*., 1997, 2000).

c) Les enzymes auxiliaires

D'autres enzymes appartenant à la famille des oxydases sont impliquées de façon directe ou indirecte dans la dégradation des constituants ligno-cellulosiques du matériau bois. Ainsi, certaines d'entre elles, comme l'aryl alcool oxydase (AAO), la glyoxal oxydase (GOx), la pyranose oxydase (POD), l'aryl alcool déhydrogénase (AAD) et les quinones réductases (Qr**)**, sont responsables de la

production de l'eau oxygénée indispensable au fonctionnement des peroxydases (Tanaka *et al.*, 1991, 1993,1996 ; Shah et Nerud, 2002).

d) Autres mécanismes impliquant les AOS

La dégradation du bois peut également faire intervenir des mécanismes non enzymatiques impliquant des espèces oxygénées actives. L'eau oxygénée peut par exemple avoir une action directe dans la dégradation de la lignine ou des polysaccharides en participant à des réactions telles que celles de Fenton (Wood, 1994 ; Hirano *et al*., 1995 ; Enoki *et al.*, 1989, 1992, 1997 ; Tanaka *et al*., 1999) ou d'Haber Weiss (Leonowicz *et al*., 1999) conduisant toutes deux à la formation de radicaux hydroxyles très réactifs.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\ominus} + OH^{\bullet}$$ Réaction de Fenton

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + O_2$$ Réaction d'Haber Weiss

Figure 18. Principales réactions conduisant à la formation d'ion hydroxyle

Il a été montré que les réactions de Fenton mettaient en jeu des substances extracellulaires comme des glycopeptides de faible masse moléculaire capables de complexer le fer. Une autre hypothèse concernant le rôle des glycopeptides isolés dans le milieu extracellulaire implique leur effet dans la réduction l'O_2 en $HO^{\cdot}$ en présence de donneurs d'électrons dans le cas des champignons de pourritures brune.

Les pourritures brunes et, dans une moindre mesure, les pourritures blanches utilisent des cycles hydroquinone-quinone pour produire le fer (II) nécessaire à la réaction de Fenton pour former les radicaux hydroxyles impliqués dans la dégradation des polysaccharides (Goodell *et al*., 1997 ; Enoki *et al*., 1997 ; Kerem, 1999 ; Xu et Goodell, 2001).

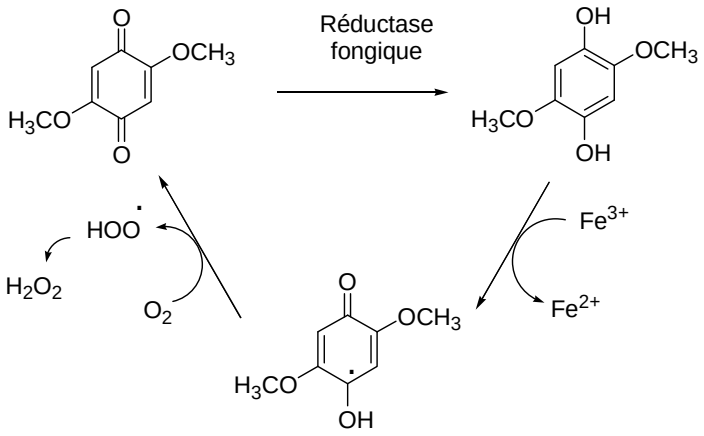


Figure 19. Mécanisme de réduction des ions ferriques et de production d'eau oxygénée proposé par Kerem (1999)

Les espèces oxygénées actives, telles que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), l'eau oxygénée (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles ($HO^{\cdot}$), sont produites par de nombreuses réactions biochimiques, physico-chimiques et sont considérées comme des facteurs primaires des dommages oxydatifs des constituants ligno-cellulosiques du matériau bois (Tanaka *et al*., 1985). Les espèces oxygénées actives et autres radicaux libres sont également à l'origine de réactions de dégradation des cellules végétales vivantes conduisant à un stress oxydatif (Du *et al*., 2004 ; Guajardo *et al*., 2006).

La cellobiose déshydrogénase (CDH), une glycoprotéine de 90 KDa constituée de 752 acides aminés (Raices *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 1996), a été associée à la production des radicaux hydroxyles et participe à la dégradation de la lignine *via* l'oxydation des composés phénoliques (Cameron et Aust, 2001). En outre, du fait de leur taille trop importante par rapport à la porosité des parois cellulaires du matériau bois, certaines enzymes agissent par l'intermédiaire de Mn^{3+} ou de $HO^{\cdot}$ (Hirano *et al.*, 1997).

Le radical $O_2^{\cdot-}$ est une autre espèce oxygénée fréquemment rencontrée. Il ne réagit pas avec la lignine, ni dans les processus enzymatiques impliqués directement dans la dégradation de la lignine. Cependant, certaines réactions sont provoquées par le radical superoxyde agissant comme réducteur ou comme oxydant. En tant qu'oxydant, il convertit Mn^{2+} en Mn^{3+}. Il peut également réagir avec l'eau oxygénée pour former un radical hydroxyle par la réaction de Haber-Weiss ou, par l'intermédiaire d'une réaction de dismutation conduire à H_2O_2 (Guillen *et al.*, 2000).

$$Mn^{2+} + O_2^{\bar{\bullet}} + 2H^+ \longrightarrow Mn^{3+} + H_2O_2$$

$$O_2^{\bar{\bullet}} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2$$

$$2O_2^{\bar{\bullet}} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Figure 20. Réactions impliquant le radical superoxyde

e) Bilan global

Il apparaît donc qu'un certain nombre d'espèces radicalaires soient impliquées dans la dégradation du bois et tout particulièrement de la lignine. La Figure 21 reprend les différentes réactions d'oxydation impliquées dans la dégradation de la lignine sous forme d'un schéma synthétique (Martinez *et al*., 2005).

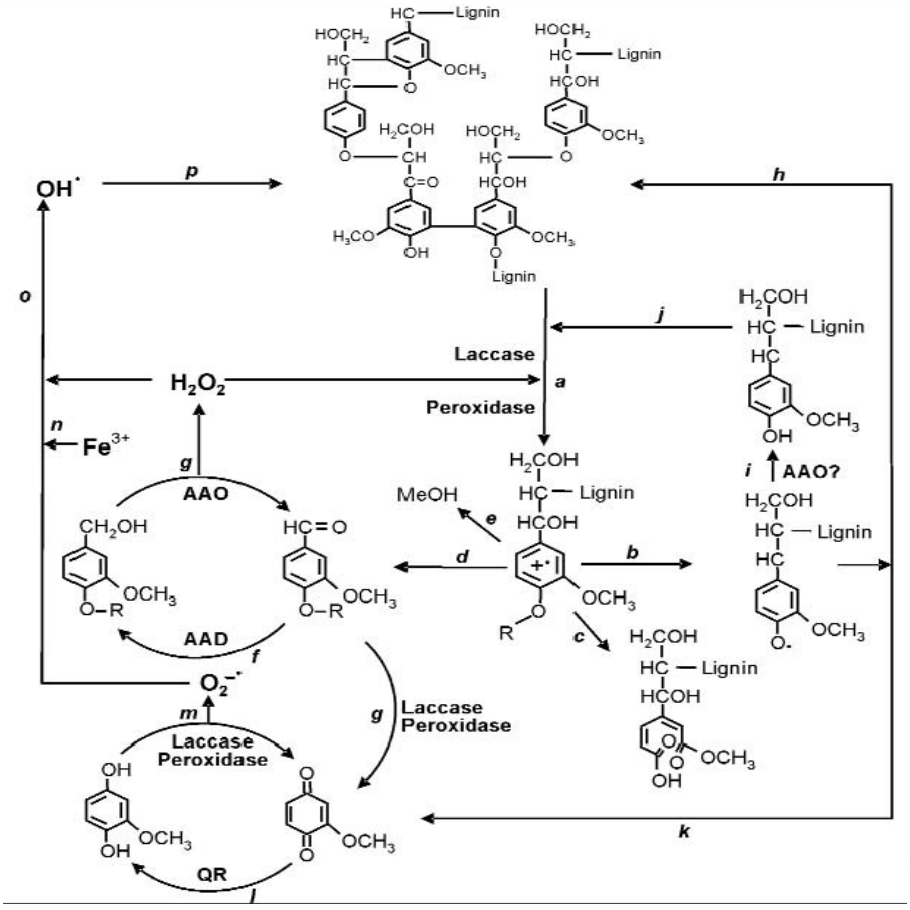


Figure 21. Biodégradation de la lignine impliquant les réactions enzymatiques et non enzymatiques

Au vu des mécanismes précédents, la dégradation du bois met en jeu de nombreux processus oxydants impliquant des radicaux qui conduisent à la dépolymérisation du biopolymère. Ces mêmes radicaux sont également à l'origine du vieillissement et de la dégradation des polymères de synthèse et de bien d'autres polymères d'origine naturelle (Zweifel, 1997). Ces réactions de dégradation peuvent intervenir pendant la fabrication ou à tout moment pendant les différents stades d'utilisation des polymères, provoquant des modifications esthétiques ou mécaniques préjudiciables au matériau.
Dans ce contexte, l'utilisation d'antioxydants peut constituer une alternative intéressante pour réduire l'efficacité des systèmes enzymatiques fongiques impliqués dans la dégradation du bois et limiter de ce fait le recours à l'utilisation de fongicides.

I.1.3. PRESERVATION DU BOIS

I.1.3.1. Les différentes classes d'usage et les risques encourus

La norme NF EN 335-2 intitulée « Durabilité du Bois et des Matériaux dérivés du Bois - Définition des classes d'emploi » permet de définir le type de traitement à utiliser en fonction des conditions d'utilisation d'un ouvrage donné et des risques biologiques auxquels ce dernier sera exposé. En fonction de la situation en service de l'ouvrage, sont ainsi distinguées, cinq classes d'emploi différentes notées de 1 à 5 et correspondants à des risques de biodégradation de plus en plus importants. Le Tableau 1, extrait de cette norme, décrit les principales classes d'usage et les risques encourus par le bois (NF EN 335-2, 2007).

Tableau 1. Définition des classes d'emploi du bois et des risques encourus

Classe d'emploi	Situation générale en service	Description de l'exposition à l'humidification en service	Agents biologiques	
1	À l'intérieur, sous abri	sec	Coléoptères foreurs du bois	En cas de présence possible de termites cette classe est désignée **1T**
2	À l'intérieur ou sous abri	occasionnellement humide	Comme ci-dessus + Champignons de discoloration + Champignons de pourriture	En cas de présence possible de termites cette classe est désignée **2T**
3	**3.1** À l'extérieur, au dessus du sol, protégé	occasionnellement humide		En cas de présence possible de termites cette classe est désignée **3.1T** ou **3.2T**
	3.2 À l'extérieur, au dessus du sol, non protégé	fréquemment humide		
4	**4.1** À l'extérieur, en contact avec le sol et/ou l'eau douce	à prédominance ou en permanence humide	Comme ci-dessus + Champignons de Pourriture molle	En cas de présence possible de termites cette classe est désignée **4.1T** ou **4.2T**
	4.2 À l'extérieur, en contact avec le sol (sévère) et/ou l'eau douce	humide en permanence		
5	Dans l'eau salée	humide en permanence	Champignons de pourriture Champignons de Pourriture molle Térébrants marins	**A** Térédinidés Limnoria
				B comme en A + Limnoria tolérant à la créosote
				C comme en B + Pholades
NOTE Il n'est pas nécessaire de protéger le bois contre tous les agents biologiques énumérés car ceux-ci peuvent ne pas être présents ou ne pas avoir d'importance économique dans toutes les conditions de service de toutes les régions géographiques. Il est possible d'assigner une classe d'emploi supérieure si l'on prévoit des conditions de service pouvant provoquer une humidification inattendue du bois, par exemple du fait de défauts de conception, d'une mauvaise qualité ou d'un manque d'entretien				

Selon les classes d'emploi et les risques encourus, des techniques de traitement plus ou moins efficaces sont envisageables. Les procédés de traitement comme l'aspersion, le badigeonnage ou le trempage sont utilisés pour des traitements superficiels du matériau, alors que les techniques de type vide pression sont utilisées lorsqu'une imprégnation à cœur est nécessaire. La nature des produits utilisés dépend également des risques encourus : l'utilisation de produits fongicide, insecticide ou termiticide sera envisagée en fonction de chaque type de situation. La fixation et la résistance du produit au lessivage seront également des paramètres importants à prendre en compte.

Etant donné la suite de notre travail, nous nous contenterons de décrire uniquement les produits fongicides utilisés pour la préservation du bois.

I.1.3.2. Les fongicides utilisés : historique et situation actuelle

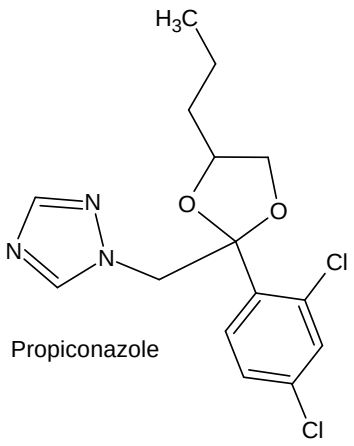
Historiquement, les produits de préservation peuvent être classés en trois grandes familles (European standard, 1979 ; Loferski, 1999, 2001) :

- les goudrons et les huiles
- les produits organiques
- les produits hydrosolubles

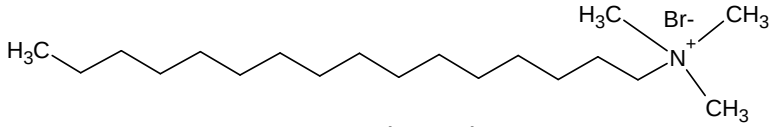
Dans la catégorie des goudrons et des huiles, on rencontre majoritairement les créosotes obtenues par distillation de matière organique. On distingue des créosotes légères correspondant à la fraction distillant en premier et des créosotes lourdes correspondant à la fraction distillant à plus haute température. Bien qu'abondamment utilisées depuis la fin du 19ème siècle jusque dans les années 1960, la créosote est de nos jours peu utilisée du fait de sa toxicité et de l'aspect inesthétique au traitement (couleur, odeur…). Constituée d'un mélange extrêmement complexe d'hydrocarbures aromatiques, de composés phénoliques et d'hydrocarbures aromatiques azotés, la créosote présente des propriétés hydrofugentes et biocides à la base des performances de ce produit utilisé pour traiter le bois destiné à des classes d'emploi de catégorie 4 ou 5 (Borgin et Corbett, 1970a ; AWPA, 1999).

Les composés organiques sont constitués de différents produits appartenant à des familles chimiques très différentes. On peut ainsi trouver des organochlorés, des carbamates, des triazoles… Ils ont été pendant longtemps utilisés en solution dans des solvants organiques associés ou non à des résines de fixation. Généralement insolubles dans l'eau, ces composés se fixent dans le bois après évaporation du solvant ayant servi à les introduire dans le bois, laissant le produit à la surface des parois cellulaires (Yamada *et al.*, 1998). A l'heure actuelle, ces produits sont de plus en plus utilisés en phase aqueuse sous forme d'émulsion ou de microémulsion du fait des nouvelles réglementations visant à réduire les émissions de COV (composés organiques volatiles) (Mehlhorn *et al.*, 1987 ; Gillham *et al.*, 1987 ; Reimer, 1992 ; Pinter *et al.*, 1993 ; Marias *et al.*, 2001 ; Cui et Preston, 2006 ; Hyvonen *et al.*, 2006). Différents produits à l'origine des progrès dans le domaine de la préservation du bois et de l'utilisation de plus en plus importante de ces derniers, dans la majorité des pays occidentaux, ont pratiquement disparu des compositions actuelles à cause de leur forte toxicité. C'est le cas notamment du pentachlorophénol (PCP) longtemps utilisé comme fongicide, ou de composés organochlorés, comme l'aldrine ou la dieldrine utilisés comme pesticides. Actuellement, le PCP a été remplacé par des produits moins toxiques comme les triazoles (propiconazole, azaconazole, tébuconazole) (Minoru, 1990 ; Acda *et al.*, 2001), les sels d'ammonium quaternaire (chlorure de didécyldimethyl ammonium), des carbamates (IPBC), des complexes organométalliques (oxine de

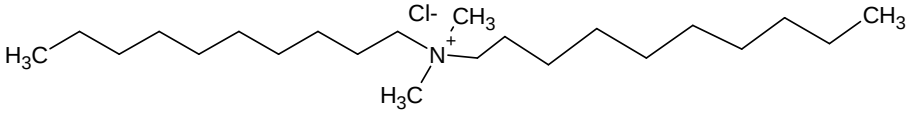
cuivre, citrate de cuivre) (Devinsky *et al.*, 1985 ; Efanov *et al.*, 2001 ; Jiang et Walker, 2007a,b). Les insecticides de la famille des pyrèthres remplacent pour leur part les organochlorés (Jin *et al.*, 1992 ; Magin *et al.*, 1997). Tous ces produits sont généralement utilisés en classe 2 et 3. Leurs utilisation en classe 4 restent limitées, mais sont de plus en plus fréquentes du fait de l'abandon de la créosote et des formulations multisels utilisées jusqu'alors dans ce domaine. Quelques formules des différents produits cités ci-dessus sont reprises dans la Figure 22.



Propiconazole



CTBA : Bromure de cétyl-triméthyl-ammonium



DDAC : Chlorure de didecyl-diméthyl-ammonium

Figure 22. Exemples de produits de préservations

Les composés hydrosolubles correspondent généralement à des produits minéraux introduits dans le bois sous forme de solutions aqueuses. Le traitement des bois destinés à des utilisations en classe 4 a été réalisé pendant longtemps en grande partie à l'aide de formulations multisels à base de chrome, de cuivre et d'arsenic, connues sous le nom de formulations CCA **(**Yamada *et al.*, 1998 ; Nicholas *et al.*, 2000). Leur consommation est passée de 450 000 à plus 1 000 000 de mètres cubes de bois traités entre 1968 et 1977 aux Etats Unis (Lahiry, 1998a,b ; Kartal, 2001). Elles sont toxiques pour les champignons lignivores, les insectes et les térébrants marins. Les CCA protègent efficacement le bois mis en service dans les classes de risques biologiques élevées (classe 4 et 5). Ces sels peuvent toutefois induire de nombreuses pathologies chez les êtres vivants qui conduisent actuellement à leur abandon progressif dans la plupart des pays industrialisés (Lahiry, 1998). Un autre problème est la gestion des déchets de bois traités arrivés en fin de cycle. En effet, la combustion des bois traités au CCA génère des émissions gazeuses toxiques dues à leur forte teneur en arsenic dans les cendres volantes et à la présence d'arsenic gazeux As_4O_6 (Hernould *et al.*, 1993 ; Zableta *et al*., 1996). Une autre famille de produits minéraux très en vogue à l'heure actuelle concerne les dérivés du bore. Le bore est un biocide intéressant car il présente une toxicité très faible

(comparable à celle du sel de table) tout en offrant une efficacité insecticide et une efficacité fongicide satisfaisantes. Il présente également d'autres avantages non négligeables : c'est un composé incolore, inodore et ignifugeant, il diffuse parfaitement dans le bois et n'altère pas ses propriétés mécaniques. On le retrouve ainsi dans la composition de nombreux produits de préservation sous différentes formes : acide borique, triméthylborate, CCB, Borax ou encore Tim-Bor®. Les produits à base de bore sont couramment utilisés pour traiter des bois qui seront utilisés en classes de risque 1, 2 et 3a. Les classes 1 et 2 posent peu de problèmes car le bois n'est soumis que très exceptionnellement à des intempéries. En revanche, en classe 3a, les bois ne sont plus à l'abri de la pluie et dans ce cas, le bore présente un gros inconvénient : il est facilement lessivable. Différentes recherches sont donc menées actuellement pour augmenter la fixation du bore dans le bois et limiter son lessivage (Bock *et al.*, 1979 ; Takafumi, 1995 ; Gezer *et al.*, 1999 ; Toussaint-Dauvergne *et al.*, 2000 ; Fritschi *et al.*, 2000 ; Thevenon et Pizzi, 2003 ; Hwang *et al.*, 2005).

I.1.3.3. Environnement et nouvelles alternatives

Dans un souci de réduire les nuisances dues à l'utilisation de biocides, la directive biocide mise en place en 1998 en Europe a entraîné une remise en question des produits de préservation utilisés jusqu'à présent. Certains produits jugés trop toxiques pour l'environnement, ont été de ce fait abandonnés au profit de produit moins toxiques. De même, les contraintes environnementales de plus en plus sévères et surtout la limitation des COV ont totalement modifié les pratiques traditionnelles de préservation du bois conduisant progressivement au remplacement des produits en phase solvant par des produits en phase aqueuse. Tous ces changements provoquent tout naturellement un regain d'intérêt pour le développement de nouvelles alternatives de protection du bois plus respectueuses de l'environnement. C'est ainsi que l'on a assisté au cours des dernières années au développement de méthodes dites « non biocides » faisant appel à la modification de la structure du matériau impliquant soit des traitements thermiques (Hill, 2006 ; Corbat Holding, 2006), soit des traitements chimiques (Courtois *et al.*, 2006 ; Hill, 2006). Une autre alternative consiste à utiliser différents additifs destinés à renforcer l'efficacité de biocides actuellement sur le marché, le développement de nouveaux principes actifs devenant de plus en plus coûteux et difficile (Walker, 1994,1998 ; Olson, 1998).

Dans l'optique de développer des traitements de préservation à faible impact environnemental, des études menées au laboratoire ont montré que des chélateurs de métaux tels que la tropolone pouvaient limiter voire inhiber la croissance de certains champignons (Baya *et al.*, 2001;

Diouf *et al*., 2002). Une explication vraisemblable du rôle de ces chélateurs réside dans la diminution de la biodisponibilité des métaux nécessaires au métabolisme des champignons que ce soit pour leur développement ou pour dégrader la matière lignocellulosique. L'utilisation d'autres types de chélateurs comme les acides hydroxamiques, connus pour leurs propriétés complexantes de métaux, a également été envisagée. D'autres études, menées sur l'utilisation d'un acide hydroxamique cyclique, la 2-hydroxypyridine-N-oxyde ont montré des résultats intéressants sur la protection d'éprouvettes de bois (Gérardin *et al*., 2004 ; Mabicka *et al*., 2004). Parallèlement à ces études sur les chélateurs, d'autres travaux ont montré que des antioxydants pouvaient agir en synergie avec différents produits de préservation conduisant à des formulations plus respectueuses de l'environnement (Schultz et Nicholas, 2002 ; Palestis *et al.*, 2004 ; Smith *et al.*, 2005). En effet, des travaux récents rapportés par Schultz ont montré que l'association de BHT (tertButyl-Hydroxy-Toluène), un antioxydant phénolique, à des biocides tels que le propiconazole ou le chlorure de didecyldiméthylammonium permettait de réduire la quantité de biocides nécessaire du fait de fortes synergies entre ces produits (Schultz et Nicholas, 2002). D'autres antioxydants phénoliques comme l'Irganox 1076 peuvent présenter des effets synergiques avec différents chélateurs (Gérardin, 2003 ; Mabicka *et al*., 2004,2005 ; Dumarçay *et al.*, 2005 ; Bakhsous *et al.*, 2006).

I.2. LES ANTIOXYDANTS

I.2.1. GENERALITES

Les phénomènes d'oxydation sont à la base de la dégradation de la plupart des matériaux. C'est le cas notamment des matières plastiques, qui ont fait l'objet de nombreuses études réalisées pour comprendre ces phénomènes d'oxydation. La Figure 23 rassemble les différents mécanismes impliqués dans la génération d'espèces radicalaires et les moyens mis en œuvre pour pallier à ces réactions de dégradation (Zweifel, 1997).

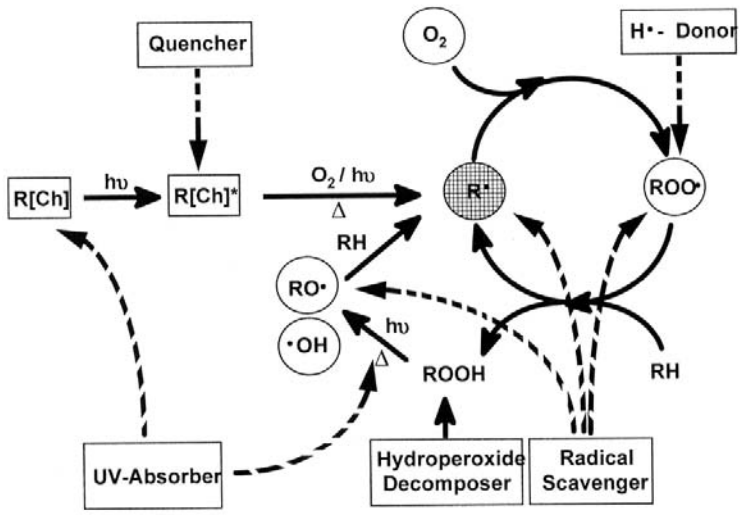


Figure 23. Mécanismes impliqués dans la dégradation des polymères

Les similitudes entre les espèces oxydantes impliquées dans la dégradation des polymères synthétiques et celles impliquées dans la dégradation du bois permettent de penser que les agents de stabilisation utilisés pour les matières plastiques pourraient avoir des effets sur la durabilité du bois. Ceci nous a poussés à orienter notre recherche bibliographique sur la nature et le mode d'action des antioxydants utilisés dans l'industrie plastique.

En fonction de leur mode d'action, les antioxydants peuvent être classés en deux grandes catégories :

- ceux qui limitent la propagation des chaînes d'oxydation, appelés antioxydants par rupture de chaînes ou encore piégeurs de radicaux libres (radical scavengers). Ce sont le plus souvent des donneurs d'hydrogène (H-donors) ou des nitroxyles ;

- ceux qui empêchent ou limitent les amorçages de chaînes appelés antioxydants préventifs, tels que les désactivants des métaux (Fe et Cu interviennent souvent dans le processus d'amorçage), les décomposeurs de peroxydes, et les stabilisateurs à la lumière (absorbeurs UV ou désactivant des états excités).

I.2.2. LES DIFFERENTES FAMILLES D'ANTIOXYDANTS

Les antioxydants ont fait l'objet de nombreuses études (Scott, 1993 ; Zweifel, 1997 ; Starnes, 1999). La compréhension de l'oxydation des produits organiques par l'oxygène (autooxydation) et sa prévention est en effet d'un grand intérêt aussi bien pour la conservation des produits manufacturés

(polymères, produits cosmétiques, produits agroalimentaires…) que pour leurs actions dans les systèmes biologiques (lutte contre les maladies liées à des dégénérescences cellulaires). Les antioxydants sont naturellement présents dans toutes les plantes, les micro-organismes, les champignons et même dans les tissus animaux.

I.2.2.1. Antioxydants par rupture de chaînes

Les antioxydants par rupture de chaîne représentent une catégorie importante d'antioxydants qui interviennent au niveau des processus d'oxydation dans de nombreux systèmes chimiques et biologiques en piégeant les radicaux responsables de l'oxydation (Schmidt et Kunert, 1986). Différentes catégories d'antioxydants peuvent fonctionner de cette manière.

I.2.2.1.1. Donneurs d'hydrogène

Les donneurs d'hydrogène bloquent les réactions d'oxydation en chaîne en fonctionnant comme « pièges » de radicaux. Pour être efficace l'antioxydant AH doit piéger le radical $R^{\cdot}$ très réactif en donnant un radical $A^{\cdot}$ moins réactif :

$$\mathbf{X^{\bullet} + AH \rightarrow A^{\bullet} + XH}$$

Le radical formé à partir de AH doit être stable et disparaître en donnant des produits peu réactifs. Certaines vitamines sont par exemple des éléments essentiels de lutte contre des radicaux hydroxyles dans les systèmes biologiques. Elles sont contenues dans de nombreux champignons (*Psalliota campestris*), fruits et légumes, tels que les oignons (*Allium cepa*) (Cordoda-Pedregosa *et al.*, 2003), le chou blanc (*Brassica oleracea var alba*), le poivre (*Capsicum annuim*), la tomate (*Solanum lycopersicum)* (Adams *et al.*, 2001 ; Racchi *et al.*, 2002 ; Rosales *et al.*, 2006), la goyave (*Psidium guajava L*) (Joy *et al.*, 1988 ; Jawaheer *et al.*, 2003 ; Roberts et Gordon, 2003)… etc.

Plusieurs types de composés peuvent jouer le rôle de donneur d'hydrogène. Les plus fréquemment rencontrés sont les composés phénoliques, les amines aromatiques et les benzofuranones.

a) Les composés phénoliques

Les antioxydants phénoliques sont parmi les stabilisateurs les plus utilisés dans le domaine des polymères. Ils désactivent les radicaux peroxydes impliqués dans la dégradation de ces macromolécules (Figure 24).

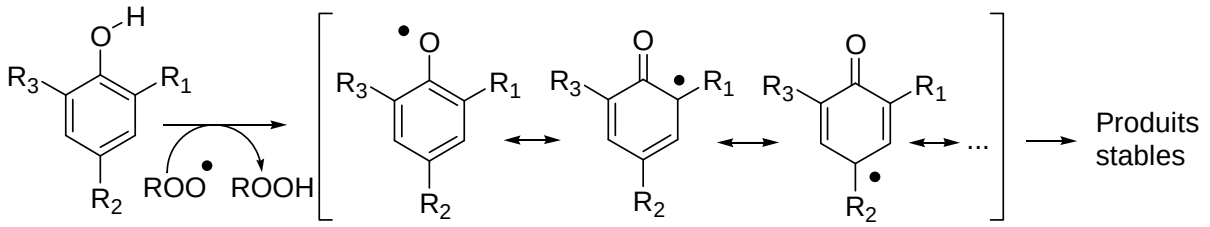


Figure 24. Stabilisation du radical phénoxyl

La stabilité du radical phénoxyl formé est fonction de l'encombrement stérique des substituants en position 2 et 6 (R_1 et R_3). De plus, les groupements alkyles stabilisent le radical par effet inductif donneur. A température ambiante, ces radicaux sont incapables de réagir avec d'autres atomes d'hydrogène du polymère. Le BHA (ter-Butyl-Hydroxy-Anisole) et le BHT (ter-Butyl-Hydroxy-Toluene) sont des composés phénoliques synthétiques couramment utilisés comme antioxydants dans l'agroalimentaire.

Les composés phénoliques sont également extrêmement répandus dans le monde végétal. L'activité antioxydante des extraits phénoliques de différentes plantes et essences de bois a fait l'objet de différentes études (Noferi *et al.,* 1997 ; Lodovici *et al.,* 2001 ; Pizzi *et al.,* 2004). Des composés actifs, tels que des tannins ou des flavonoïdes, ont été isolés et caractérisés (Okamura *et al.,* 1993).

La vitamine E (α-tocophérol) est connue pour agir en tant qu'antioxydant *in vivo* (Gali-Muhatsib *et al.,* 1999 ; Yokozawa *et al.,* 2000 ; Kazumi *et al.,* 2003 ; Korotkova *et al.,* 2003).

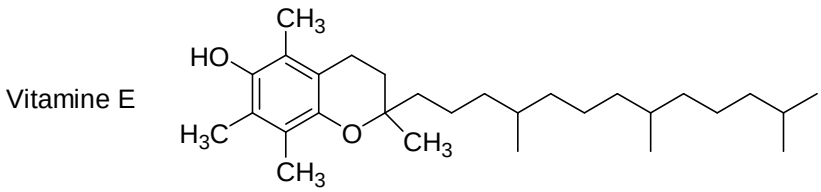


Figure 25. La vitamine E (α-tocophérol)

Présente dans les cellules vivantes, elle participe activement à l'inhibition des radicaux libres impliqués dans les processus d'oxydation des tissus (Korotkova *et al.,* 2003). Elle est également

considérée comme le principal inhibiteur de la peroxydation lipidique (Khalil, 2002) et a été utilisée pour stabiliser des polymères (Al-Malaika, 2000).

Les flavonoïdes de l'huile de canola ont été rapportés pour posséder une activité antioxydante supérieure à celle d'antioxydants synthétiques tels que le BHA et le BHT (Udaya *et al.,* 2003). Ces composés sont très étudiés comme agents antiviraux, anti-allergènes, anti-inflammatoires ou anticancéreux (Duthie *et al.,* 1997 ; Pietta *et al.,* 2000 ; Rice Evans *et al.,* 2001). Présents dans les fruits, les légumes et les boissons, les flavonoïdes représentent les constituants importants de la nourriture humaine. Les flavonoïdes peuvent se diviser en 6 classes : flavanes, flavanones, flavones, isoflavones, flavanols et anthocyanines. Ils peuvent se rencontrer dans les plantes sous forme libre ou à l'état de glycosides (Makarov *et al.,* 2005). Les différentes familles de flavonoïdes découlent toutes d'une même structure de base (Ferguson *et al.,* 2001). Certains flavonoïdes telles que la quercétine, la catéchine et l'épigallocatéchine sont connus pour leur pouvoir anti/pro-oxydant (Labuda *et al.,* 2003).

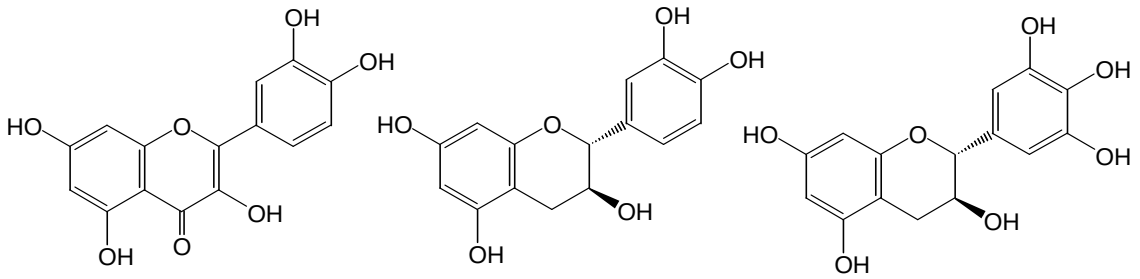


Figure 26. Structure de quelques flavonoïdes

Les flavonoïdes sont bien connus comme molécules réductrices naturelles et jouent un rôle important dans la protection des dommages oxydatifs de l'ADN, des lipides et des protéines cellulaires (Cai *et al.,* 1997 ; Duthie *et al.,* 1997 ; Boehm *et al.,* 1998 ; Abalea *et al.,* 1999 ; Ng *et al*., 2000 ; Bolton, 2002). Ce comportement est encore mal élucidé dans divers systèmes. Cependant, les propriétés antioxydantes ont été attribuées à leur caractère réducteur permettant de neutraliser les espèces oxygénées réactives (Jain *et al*., 1999), mais aussi à leur aptitude à chélater le fer ou d'autres métaux dans le cas de la quercétine (Sestili *et al.,* 1998). Dans le cas de la catéchine, une réduction chimique d'oxoradicaux de l'ADN ainsi que des radicaux hydroxyles libres a été mise en évidence (Anderson *et al.,* 2001). Le comportement pro-oxydant de la quercétine a été expliqué par l'activation du fer (Puppo, 1992) ou le recyclage redox de cuivre (Yamashita *et al.,* 1999). Les métaux réduits réagissent avec de l'oxygène ou de l'eau oxygénée pour former les initiateurs de l'oxydation. Les flavonoïdes sont également des pro-oxydants dans les systèmes de la production de NO (Ohsima *et*

al., 1998). La structure et les propriétés des flavonoïdes se retrouvent également dans les polyphénols et les tannins condensés qui sont des oligomères de flavan-3-ol comme la catéchine (Bolton, 2002 ; Smythies *et al.*, 2002 ; Monks et Jones, 2002 ; Alegria *et al.*, 2002, 2004).

b) Les amines aromatiques

Ces antioxydants, appartenant à la famille des anilines, sont capables de piéger les radicaux libres. Du fait de leur toxicité, la plupart des dérivés des amines aromatiques ne sont pas autorisés pour des applications en contact avec les aliments, tels que les matériaux d'emballage, ce qui limite largement leur utilisation (Uehleke, 1962 ; Brennan *et al.*, 1999).

c) Les benzofuranones

Une autre famille de piégeurs de radicaux est constituée par les benzofuranones (Pauquet, 1999). Ces composés se comportent comme des donneurs d'hydrogène impliquant la formation d'un radical benzylique qui est capable de réagir avec les radicaux pour former des produits inactifs (Kalyanaraman, 1990 ; Roginsky *et al.*, 1998 ; Stites *et al.*, 2000).

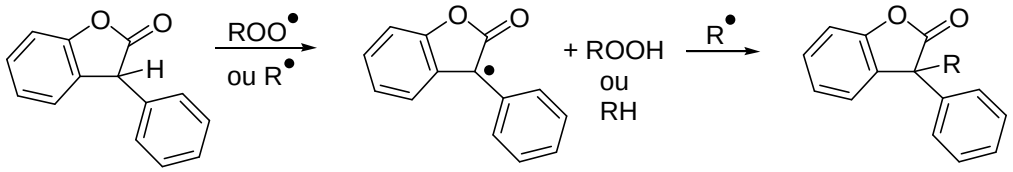


Figure 27. Mode d'action des benzofuranones

I.2.2.1.2. Les nitroxyles dérivés d'amines encombrées

Une autre catégorie d'antioxydants concerne les piégeurs de radicaux libres appartenant à la famille des amines encombrées (Hindered Amine Stabilizers, HAS) présentant une structure de type 2, 2, 6, 6-tétraméthylpypéridine.

Leur mécanisme d'action a été abondamment étudié, mais n'est pas encore totalement élucidé (Schwetlick et Habicher, 2002). Il semble cependant évident que le radical nitroxyl formé par oxydation de la fonction amine soit l'espèce active possédant les propriétés antioxydantes. Ce radical nitroxyl serait capable de piéger les radicaux alkyl pour former des N-alkoxyamines inhibant ainsi les processus d'oxydation. De plus, ces N-alkoxyamines réagiraient avec les radicaux peroxyl pour

régénérer le radical nitroxyl en formant différents produits secondaires n'intervenant pas dans les processus d'oxydation (Shilov *et al.*, 1972 ; Step *et al.*, 1994, 1995).

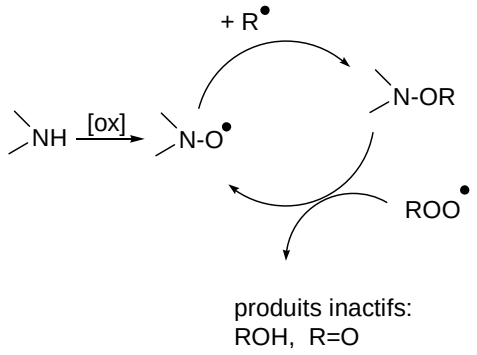


Figure 28. Mode d'action des amines encombrées faisant intervenir un radical nitroxyl

Schwetlick et Habicher rapportent également que les radicaux nitroxyl sont capables de transformer des radicaux peroxyl en produits inactifs n'intervenant plus dans les réactions d'oxydation (Figure 29) (Schwetlick et Habicher, 2002):

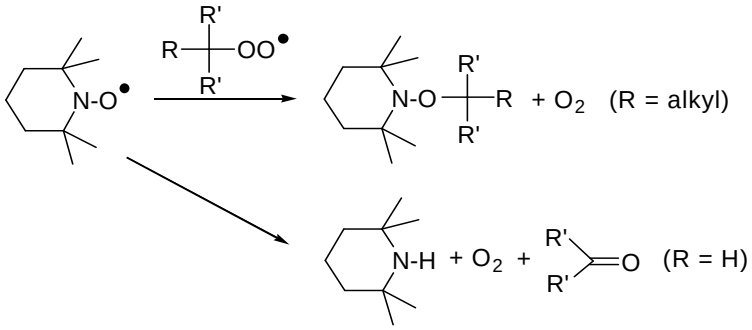


Figure 29. Désactivation des radicaux peroxyl par les radicaux nitroxyl

I.2.2.1.3. La vitamine C

L'acide ascorbique ou vitamine C est un antioxydant très efficace présent dans différentes plantes (Scandalios, 1990 ; Smirnoff *et al.*, 1996). L'acide ascorbique, soluble dans l'eau, est un composé organique qui prend part à plusieurs processus biologiques importants (Navas et Gomez-Diaz, 1995 ; Raoof, 2001 ; Sabzi et Pournaghi-Azar, 2004). Bien que cette molécule soit très fréquente, la biochimie de l'acide ascorbique chez les mammifères comme chez les plantes est peu renseignée (Seib et Toolbert, 1982 ; Davies *et al.*, 1991). Ceci est peut être du au fait que les

méthodes de détection de la vitamine sont limitées (Roe et Kuether, 1943 ; Tomiko et Sakari, 1970 ; Ogata et Kosugi, 1970; Kishida *et al.*, 1992 ; Takeda *et al.*, 1999 ; Washko, 1992).

L'acide ascorbique agit comme un antioxydant par rupture de chaîne (Martini et Seiller, 2003), puisqu'au contact de radicaux libres, la molécule se transforme en radical ascorbyle dont la durée de vie est de plusieurs heures (Tolbert *et al.*, 1975 ; Holland *et al.*, 1993 ; Mitchnick et Gwozdz, 2000 ; Arya *et al.*, 2000 ; Naguib et Yousry, 2000 ; Mary *et al.*, 2004). D'après la littérature (Mazor *et al.*, 2006), l'acide ascorbique (AH_2) réagit en tant que donneur d'électron pour produire un radical libre ($AH^{\cdot}$) ou à un radical anion ($A^{-\cdot}$), conduisant par la suite à la formation d'acide déhydroascorbique comme ultime produit de la réaction. La formation du radical anion ($A^{-\cdot}$) est facilitée par la stabilité de ce dernier, liée à sa pseudo aromaticité (Njus *et al.*, 1991 ; Komsiyska *et al.*, 2006).

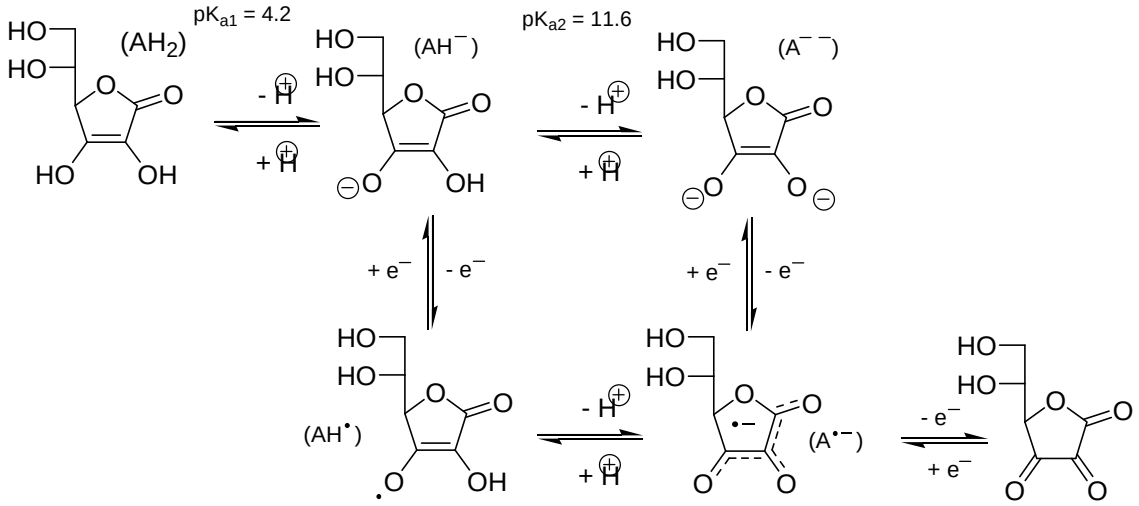


Figure 30. Mode d'action de l'acide ascorbique

L'acide ascorbique présente deux propriétés importantes pour faire de lui un antioxydant efficace (Velisek *et al.*, 1974 ; Carr *et al.*, 1999). D'une part, il possède un potentiel de réduction de l'ascorbate faible et d'autre part son produit d'oxydation, le radical ascorbyle, est stabilisé par résonance. Ce faible potentiel de réduction permet à l'ascorbate et à son radical ascorbyle de réduire pratiquement toutes les espèces oxydantes présentes dans les systèmes biologiques (Conklin et Barth, 2004 ; Foyer et Noctor, 2005 ; Rosales *et al.*, 2006). Les radicaux ascorbyles peuvent être à leur tour oxydés ou se dismuter pour former l'ascorbate et l'acide déhydroascorbique. L'acide déhydroascorbique est hydrolysé rapidement et irréversiblement en acide 2,3- dicetogulonique, qui se décompose en plusieurs autres produits (Lee *et al.*, 2004).

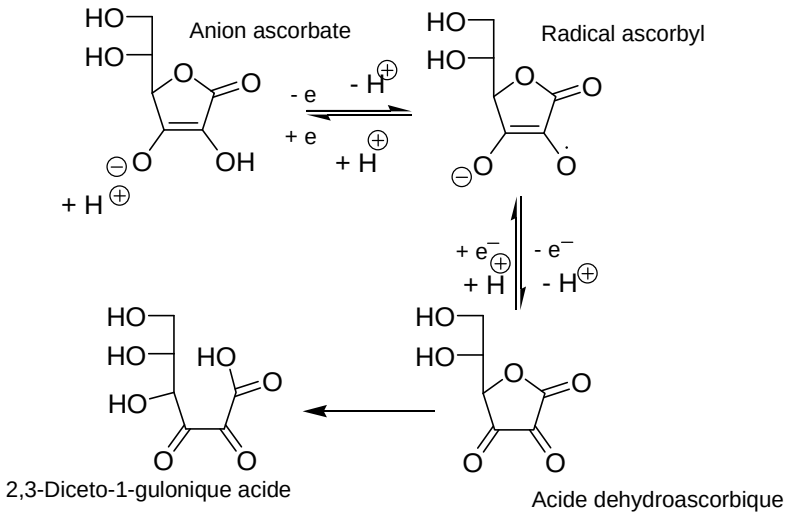


Figure 31. Hydrolyse de l'acide déhydroascorbique

L'acide ascorbique fonctionne comme agent réducteur et comme inhibiteur de radicaux libres en donnant 1 ou 2 électrons (Frei, 1989 ; Kitts, 1997). Il peut également agir en tant que réducteur en régénérant l'α-tocophérol à partir du radical α-tocopheroxyl qui est produit via le piégeage des radicaux liposolubles (Asada, 1994). En outre, l'acide ascorbique a été également considéré comme ingrédient cosmétique pour des soins de la peau en raison de son rôle salutaire contre le vieillissement de peau en favorisant la biosynthèse du collagène (Peterkofsky *et al.*, 1972 ; Tajima *et al.*, 1982 ; Gressin *et al.*, 1993) et en inhibant la mélanogenèse (Murad *et al.*, 1981 ; Lee *et al.*, 2004). Il est l'un des premiers antioxydants présents dans le plasma et dans la cellule, protégeant ainsi le cytosol et la membrane cellulaire contre les dommages oxydatifs (Frei *et al.*, 1989 ; Mittler, 1991 ; Beal, 1995 ; Wardman, 2001 ; Pessina *et al.*, 2004 ; Loke *et al.*, 2006). Il a été démontré que l'ascorbate joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération et de l'élongation cellulaire conduisant à une diminution de l'activité mitotique du méristème (Thomsen *et al.*, 1992 ; Arrigoni, 1994 ; Cordoda-Pedregosa *et al*., 2003).

L'acide ascorbique présente des effets synergétiques dans des mélanges d'antioxydants (α-tocophérol et β-carotène) protégeant l'oxydation des phospholipides (Schnefer *et al.*, 1995 ; Chepda *et al.*, 2001). Des effets similaires de synergie entre le trioxyde d'arsenic (As_2O_3) et l'acide ascorbique ont été démontrés avec l'implication potentielle de l'acide ascorbique dans le traitement de la leucémie myéloïde aiguë en augmentant l'effet apoptotique de l'As_2O_3. (Bachleitner-Hofmann *et al.*, 2001 ; Petrova *et al.*, 2004). C'est enfin l'une des plus importantes vitamines du fait de ses propriétés

antioxydantes et régulatrice de pH. Il peut être ajouté dans différents produits alimentaires et pharmaceutiques (Takanaga *et al.,* 2003) pour maintenir la qualité organoleptique et protéger les produits contre l'oxydation (Cort, 1982 ; Elliott *et al*., 1999).

Dans le bois, l'acide ascorbique et sa forme oxydée, l'acide déhydroascorbique, ont été évalués par rapport à la différenciation de trachéides au cours du développement du bois juvénile et adulte dans le mélèze sibérien (*larix siberica ldb*). L'acide ascorbique est également impliqué dans la régulation de la biosynthèse de lignine (Mittler et Zilinska, 1991 ; Takahama *et al.,* 1993, 1994; Takahana, 1994 ; Antonova *et al.,* 2004 ; Yamamoto *et al.,* 2005).

I.2.2.2. Les antioxydants préventifs

Ces composés agissent en amont des systèmes oxydatifs en évitant la formation d'espèces oxydantes.

I.2.2.2.1. Les désactivateurs de métaux

Différents cations métalliques sont impliqués comme catalyseurs dans la décomposition des peroxydes formant des radicaux réactifs. Ce problème est particulièrement important dans les câbles électriques où le plastique est en contact avec le conducteur métallique. L'emploi de stabilisateurs possédant des propriétés complexantes permet de limiter les inconvénients précédents en piégeant les ions métalliques et en ne leur permettant plus d'intervenir dans les processus de décomposition des peroxydes.

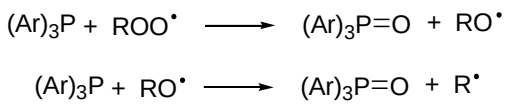
Les réactions de Fenton impliquées dans la dégradation des systèmes biologiques, et tout particulièrement du bois par les pourritures brunes, peuvent être inhibées de la même façon (Lopes *et al*., 1999 ; Diouf *et al.,* 2002 ; Yun *et al*., 2003).

I.2.2.2.2. Les réducteurs d'hydroperoxydes

Ces composés transforment les hydroperoxydes (ROOH) en espèces non radicalaires, non réactives et stables thermiquement. Les composés généralement utilisés sont des phosphites, des sulfures ou des sels métalliques de dithiocarbamates ou de dithiophosphates. Le mode d'action de ces composés consiste à réduire l'hydroperoxyde en alcool, conjointement à l'oxydation du réducteur d'hydroperoxyde (Haruna, 1995 ; Zweifel, 1997).

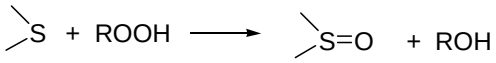
$$(C_6H_5)_3P + ROOH \longrightarrow (C_6H_5)_3P{=}O + RO$$

D’autres espèces radicalaires telles que ROO· ou RO· sont également réduites par les phosphites.



Le radical R· peut alors être piégé par un donneur d’hydrogène.

Le même type de comportement peut être observé avec les sulfures :



I.2.2.2.3. Les stabilisateurs UV

Les polymères exposés à la lumière sont susceptibles d'être dégradés par des radicaux formés sous l'action du rayonnement UV. Les absorbeurs UV permettent d'éviter ces inconvénients en absorbant les rayonnements néfastes et en permettant la disparition de l'énergie absorbée sous forme de chaleur qui conduit, dans certains cas, à la formation d'espèce radicalaire. Différentes catégories de composés appartenant aux familles décrites ci-dessous ont été proposées:

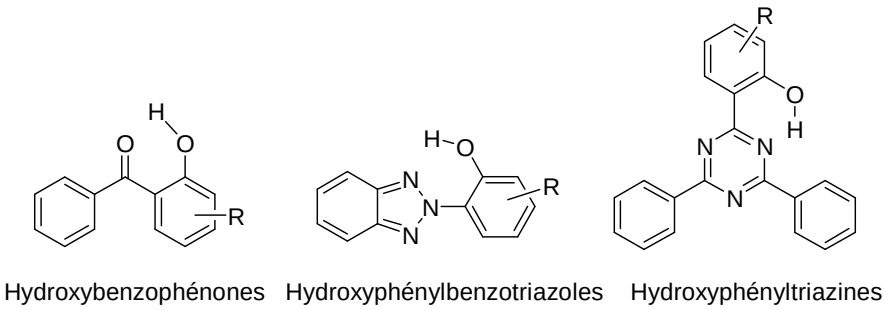


Figure 32. Différentes familles de stabilisateurs UV

Dans tous les cas, ces composés absorbent les radiations UV pour donner un état excité, qui se désactive par transfert intramoléculaire d'un proton permettant de dissiper l'énergie absorbée avant de revenir à leur état initial (Zweifel, 1997 ; Keck *et al*., 1997).

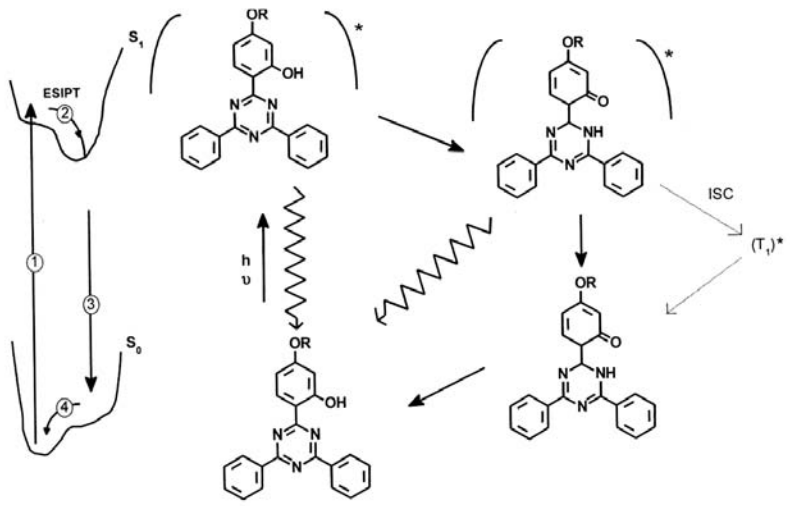


Figure 33. Mécanisme de stabilisation et de désactivation des hydroxyphényltriazines

I.3. LES TENSIOACTIFS

I.3.1. AMPHIPHILES ET AGENTS DE SURFACE : DEFINITIONS ET APPLICATIONS D'USAGE

I.3.1.1. Définition

Les molécules tensioactives sont aussi appelées agents de surface ou encore surfactifs du terme anglais « surfactant », abréviation de « SURFace ACTive AgeNT ». Leur origine est double : elles peuvent provenir soit de substances naturelles, soit de substances synthétiques (Gagnaire, 1967).

Ces molécules sont amphiphiles (amphi : les 2, philos : aimant) car elles contiennent à la fois des zones présentant une forte affinité pour les solvants polaires comme l'eau, constituant la partie hydrophile, et des zones apolaires ou peu polaires, qualifiées d'hydrophobes présentant un comportement tout à fait opposé au précédent (Larpent, 1995).

La partie hydrophile qui comporte généralement des hétéroatomes tels que l'oxygène, le soufre, l'azote ou encore le phosphore, est aussi appelée tête polaire ; la zone apolaire, le plus souvent hydrocarbonée, est désignée par le terme de queue hydrophobe.

La formule générale la plus simple peut être schématisée de la manière suivante (Figure 34):

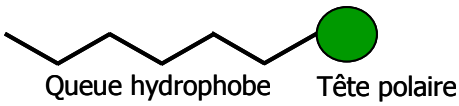


Figure 34. Représentation schématique d'un tensioactif conventionnel

Ces « constructions moléculaires » peuvent avoir plusieurs variantes. Il peut y avoir plusieurs têtes polaires de taille plus ou moins importante, ou plusieurs queues hydrophobes greffées sur un même corps et celles-ci peuvent être de différentes natures. Quelques exemples de familles de tensioactifs sont schematisés dans la Figure 35.

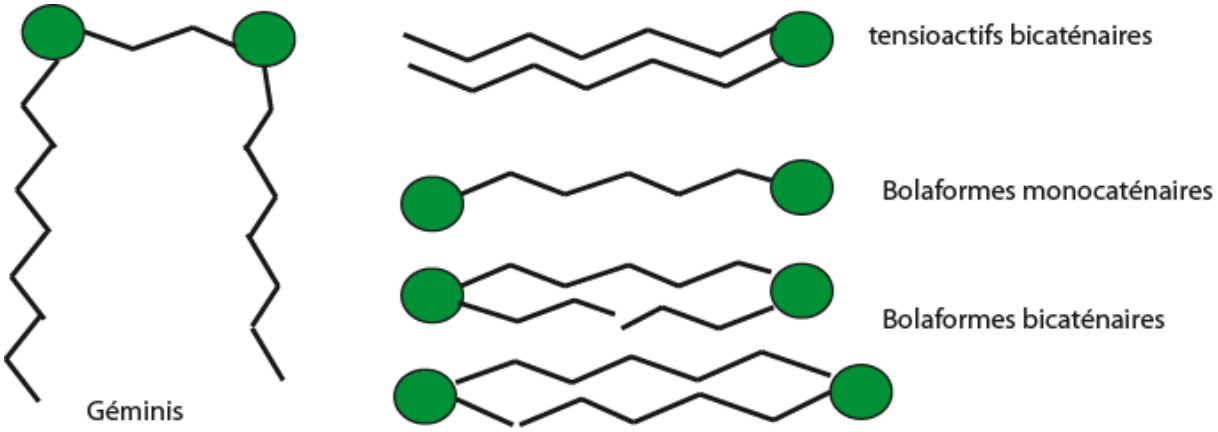


Figure 35. Structures possibles de tensioactifs

Du fait de cette double affinité, les molécules amphiphiles "ne se sentent pas bien" au sein d'un solvant, qu'il soit polaire ou apolaire. C'est pourquoi, pour des raisons de minimisation d'énergie, ces molécules vont s'adsorber aux interfaces liquide-gaz, liquide-solide ou liquide-liquide, en orientant ainsi leur tête polaire vers l'eau et leur queue vers l'huile ou vers l'air, pour former un film interfacial (liquide/liquide) ou superficiel (liquide/air). Ceci va entraîner l'abaissement de la tension superficielle.

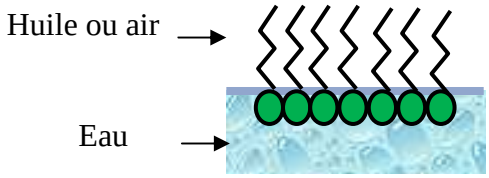


Figure 36. Comportement d'un tensioactif en présence d'eau et d'huile

Au-delà d'une certaine concentration appelée « Concentration Agrégative Critique » ou CAC, ces molécules s'organisent en agrégats qui correspondent souvent à des micelles, on parle alors de « Concentration Micellaire Critique » ou CMC. Dans l'eau, les micelles peuvent être « directes » lorsque les têtes polaires sont orientées vers l'extérieur au de la micelle contact de l'eau. Ces micelles peuvent être « inverses », les chaînes hydrophobes sont alors dirigées vers la phase huileuse les têtes polaires sont alors au cœur de la micelle (Skrylev *et al.*, 1992 ; Broze *et al.*, 2002).

Les propriétés de la plupart des agents de surface n'atteignent leur valeur maximale qu'à partir de cette concentration et la connaissance de cette dernière permet d'assurer une utilisation correcte des produits (Lorinc, 1974 ; Sanchez-Leal *et al.*, 2001).

Expérimentalement, la CMC est déterminée par le point d'inflexion de la droite établie pour une propriété physique de la solution en fonction de la concentration en surfactif (Ginn, *et al.*, 1960).

La Figure 37 illustre la rupture de pente observée au niveau de la CMC dans l'évolution des propriétés physiques.

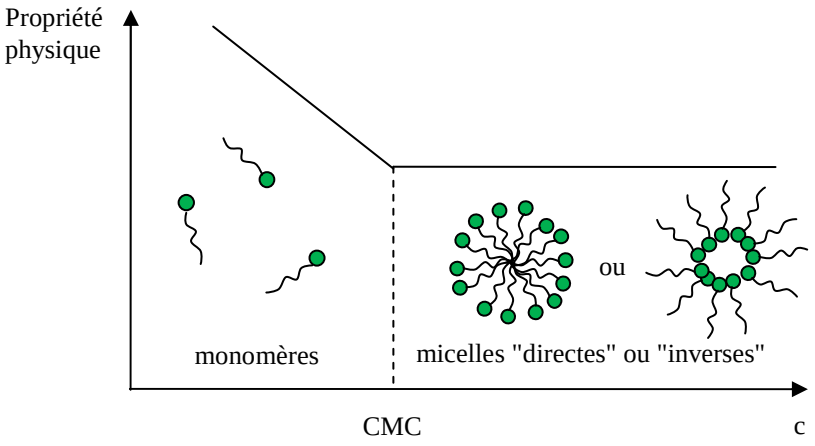


Figure 37. Evolution du comportement de tensioactifs en solution

I.3.1.2. Classification des tensioactifs

Les tensioactifs peuvent être classés suivant la nature de leur tête polaire. Sont ainsi distingués :

- **les tensioactifs anioniques** qui s'ionisent dans l'eau pour donner un anion organique. Ce sont les plus utilisés, ils correspondent la plupart du temps à des carboxylates, à des sulfonates ou à des sulfates. Leur activité est limitée aux milieux basiques. Ils peuvent être associés à un cation minéral ou organique (Vaution, 1983 ; Greek, 1990 ; Pezron *et al.*, 1996 ; Savostionnof, 1998 ; Wu et Schork, 2001 ; Behler *et al.*, 2001) ;

- **les tensioactifs cationiques** qui s'ionisent dans l'eau pour donner un cation organique. Ce sont principalement des sels d'ammoniums quaternaires, très souvent associés à un chlorure. Ils peuvent présenter des propriétés anti-microbiennes (Le Perchec, 1994 ; Fletcher et Pandey, 2003) ;

- **les tensioactifs zwittérioniques** qui possèdent à la fois une charge négative et une charge positive. On retrouve souvent dans cette classe de tensioactifs des composés de type bétaïnes ou dérivés d'aminoacides. Ils sont analogues aux phospholipides naturels, et constituent une famille de produits peu irritants et peu agressifs sur le plan biologique (Laughlin, 1981 ; Wang *et al.*, 2005) ;

- **les tensioactifs non ioniques** qui ne présentent aucune charge lorsqu'ils sont dans un solvant polaire tel que l'eau, et ce, quelque soit le pH. Ce dernier point constitue l'intérêt le plus important de ce type de composés. Ces composés sont compatibles avec les trois autres types de tensioactifs et sont donc souvent utilisés en association avec d'autres amphiphiles pour des formulations à usages spécifiques. Les têtes polaires les plus fréquemment rencontrées comportent des fonctions éther, alcool, carbonyle ou amide. Les exemples les plus importants correspondent à des esters d'acides gras ou des éthers obtenus par éthoxylation d'acides gras ou d'alkylphénols ou encore des dérivés de sucres ou de polyols de manière générale (Invernizzi et Gafa, 1973 ; Hellsten 1986 ; Ebringerova *et al.*, 1998 ; Kitatsuji, *et al.*, 1999 ; Host et Rocher, 2001 ; Gao, *et al.*, 2003).

Les tensioactifs peuvent également être classés par rapport à leur partie hydrophobe. Sont ainsi distingués :

- les tensioactifs hydrogénés ;
- les surfactifs lipidiques (plusieurs chaînes hydrophobes) ;
- les composés mésogènes (segment central rigide) ;
- les tensioactifs perfluorés ;
- les tensioactifs siliconés.

I.3.1.3. Propriétés et domaines d'utilisation

Les tensioactifs constituent l'une des grandes familles d'auxiliaires chimiques (Savostianof, 1988). Ils ont la particularité de posséder des propriétés multiples, comme celle de disperser les corps gras dans l'eau, mais peuvent aussi présenter de nombreux autres rôles (Kariyone, 1990) :

- **un pouvoir solubilisant** : les solutions d'agents de surface, au-delà de leur CMC, ont la propriété d'augmenter la solubilité apparente des composés pas ou peu solubles dans l'eau, soit en incluant dans la micelle des molécules de produits, soit en formant des micelles mixtes avec le produit à solubiliser. Ce phénomène est mis à profit, par exemple, dans la teinture des fibres polyesters ou pour la polymérisation en émulsion (Kobylecka et Skiba, 1993 ; Sobisch, 1994 ; Imanari *et al*,. 1999) ;

- **un pouvoir moussant** : il est lié aux caractéristiques mécaniques des films superficiels qui constituent les parois des bulles de la mousse. Certains tensioactifs ont la capacité de former rapidement des couches inter-faciales et superficielles, assez résistantes pour ne pas céder à la

pression interne de l'air emprisonné et à la pression externe des molécules d'eau, mais également assez élastiques pour encaisser sans éclater tous les petits chocs mécaniques au cours de leur déplacement. Cette propriété est mise à profit principalement dans les shampooings, les produits douche et les forages à mousse (Jakobs *et al.,* 2005) ;

– **un pouvoir anti-moussant** : à l'opposé, les anti-mousses sont des produits susceptibles de se rassembler aux interfaces et de désorganiser les films superficiels en faisant chuter leurs propriétés mécaniques (Wang *et al.,* 2006) ;

– **un pouvoir émulsionnant** : il permet de disperser et de maintenir en suspension un liquide dans un autre liquide non miscible. Les applications des émulsions sont très nombreuses, notamment en cosmétique, car elles permettent de présenter des principes actifs le plus souvent présents dans les corps gras sous des formes directement utilisables car dispersées dans une quantité d'eau suffisante (Lorinc, 1974; Kim *et al.,* 2000 ; Wang *et al*., 2007) ;

– **un pouvoir mouillant** : il favorise l'étalement d'un liquide sur une surface lisse et augmente la vitesse de pénétration dans les substances poreuses. Cette propriété est mise à profit quand une solution traitante doit agir sur une surface lisse (lavage des sols, traitement phytosanitaire des feuilles…) ou lorsque des corps poreux doivent être traités par une solution aqueuse (teinture et blanchiment des textiles…) (Bigorra *et al*., 1996 ; Austria *et al*, 1997) ;

– **un pouvoir dispersant** : il augmente la stabilité des suspensions de petites particules solides dans un liquide en évitant leur agrégation. Cette caractéristique est utilisée pour des dispersions de boues de forage, de pigments dans les peintures… (Imahori et Kimura, 1962 ; Gagnaire, 1967) ;

– **un pouvoir détergent** : il permet, aux agents de surface, de détacher d'un support les produits qui le souillent et de les maintenir en dispersion. Il résulte principalement de la conjugaison des pouvoirs mouillant, émulsionnant et dispersant. Il n'existe pas de détergent universel et chaque application nécessite le choix des produits et d'une formulation (Karsa, *et al.,* 1990 ; Lange et Robert, 1999).

Cette liste de propriétés n'est pas exhaustive, les agents de surface peuvent également avoir un pouvoir antistatique, épaississant, lubrifiant…, ce qui explique l'extrême diversité de leurs applications (Xia *et al.*, 1995 ; Fantini *et al.*, 1997 ; Faroux-Corlay *et al.*, 2000 ; Gaucheron *et al.*, 2001 ; Riess, 2001, 2002 ; Krafft, 2002 ; Ortial *et al.*, 2006 ; Denoyelle *et al.*, 2006). Les surfactants sont en effet indispensables dans de nombreux aspects de la vie courante.

Plusieurs grands domaines, mentionnés ci-après, font appel à de telles molécules dont la structure est plus ou moins complexe (Tadros, 1991 ; Koch, *et al.*, 1993 ; Le Perchec, 1994 ; Karsa *et al.*, 1990,1999 ; Crudden, 1999 ; Pradip *et al.*, 2002) :

- **la détergence** : qu'elle soit ménagère ou industrielle, c'est le domaine le plus important au niveau des débouchés des agents de surface. C'est également le domaine où les formules évoluent le plus depuis plus de 30 ans. Dans la détergence industrielle, on peut citer la blanchisserie mais également la métallurgie qui correspond au nettoyage des métaux (Yamada et Morita, 1973 ; Koch *et al.*, 1993 ; Hashimoto et Masayuki, 2006) ;

- **l'industrie chimique** : c'est le premier secteur industriel à mettre à profit son savoir-faire en matière de tensioactifs. Elle totalise 30 % des consommations industrielles de surfactifs. Les tensioactifs sont utilisés pour effectuer des réactions en émulsion, en particulier en polymérisation ou pour effectuer certaines hydrolyses. Ils interviennent également pour faciliter certains traitements d'extraction, de séparation, de broyage, d'évaporation… (Grigor'ev, *et al.*, 1987 ; Rigano, *et al.*, 1995 ; Schwartz et Baumstark, 2001) ;

- **l'industrie textile** : c'est le secteur qui a été à l'origine des progrès de la détergence. C'est le deuxième consommateur de tensioactifs. En plus de la détergence, ceux-ci sont présents à tous les stades, de la filature à la confection. Ils interviennent, entre autres, dans les opérations de nettoyage de fibres naturelles, ils réduisent les frictions au cours du filage et du tissage, ils sont déterminants pour les opérations de teinture, et ils minimisent la charge statique (Lorinc et Lelkes-Eros, 1977 ; Lee, 1983) ;

- **les industries pharmaceutiques et cosmétiques** : où les tensioactifs sont utilisés comme détergents, émulsifiants et dispersants. Les agents de surface sont des produits de base pour la formulation de la plupart des préparations dans le domaine de la cosmétique blanche (crèmes, lait…) et de la cosmétique rincée (shampooings, gels douche, …). Bien que les tonnages utilisés soient peu importants, la pharmacie utilise un grand nombre de tensioactifs. Ils entrent dans les formulations de

principes actifs dans les pommades, sirops et autres. Les liposomes en tant que vésicules phospholipidiques bi lamellaires, sont ainsi un cas particulier d'émulsion d'eau dans l'huile où la solution aqueuse de principe actif est emprisonnée dans deux parois hydrophobes formant des microgouttelettes dispersées dans l'huile. Ils ont aussi des applications dans le domaine médical (Ahmed, 2001 ; Sisneros et Nelson, 2001 ; You, 2003 ; Juang, *et al.*, 2004) ;

- **l'industrie agroalimentaire** : outre le fait que les tensioactifs sont utilisés pour leurs propriétés détergentes et éventuellement bactéricides, ils entrent également dans de nombreuses préparations alimentaires industrielles (mousses, crèmes, émulsions, …) pour améliorer la stabilité des émulsions, favoriser l'aération et le foisonnement, modifier la viscosité … (Kitabatake et Doi, 1988 ; Almajano et Gordon, 2004) ;

- **l'industrie pétrolière** : les tensioactifs sont utilisés à divers stades comme la récupération assistée qui consiste à utiliser une microémulsion pour améliorer le taux de récupération dans les gisements, ou encore comme le traitement des eaux d'injection par des inhibiteurs de corrosion (Bocharov et Frolov, 1983 ; Norber et Schneider, 1986) ;

- **l'industrie des matières plastiques** : les agents de surface favorisent la polymérisation de monomères. Ils sont utilisés également en tant qu'antistatique (Wang, 1975 ; Fredon, 2001) ;

- **l'industrie des peintures** : les tensioactifs permettent la mise en émulsion ou en suspension de divers constituants des peintures, tels que les solvants, résines, pigments, charges et autres (Tolstaya et Shabanova, 1976 ; Svoboda *et al.*, 1981 ; Baumstark et Tiarks, 2002 ; Choi, 2005) ;

- **les industries de la pâte à papier et de la papeterie** : les tensioactifs sont utilisés pour l'obtention de la pâte de cellulose. Ils permettent de réduire le moussage lors de la fabrication du papier, permettent aussi, le désencrage et le blanchiment ainsi que la suppression des additifs lors de la préparation du papier recyclé (Gartner, 1962 ; Akim *et al.*, 1963 ; Pavlinova *et al.*, 1968 ; Okada, 1969 ; Lopez *et al.*, 1996 ; Glasser, 2000 ; Roubroeks *et al.*, 2004 ; Gradwell *et al.*, 2004) ;

- **le secteur des minerais** : les agents de surface sont employés en tant qu'agents de flottaison car ils permettent de rendre plus hydrophobes les minéraux de haute valeur ajoutée (Zhang *et al.*, 2008).

I.3.1.4. Concept de Balance Hydrophile-Lipophille (HLB) et application dans le domaine des tensioactifs non ioniques

Les propriétés des tensioactifs dépendent de l'équilibre existant entre les parties hydrophile et hydrophobe de la molécule. Cet équilibre entre deux groupements antagonistes a été qualifié par Griffin (Griffin, 1949) sous le terme « Hydrophilic-Lipophilic-Balance » (HLB). La HLB varie de 0 à 20. Cette échelle a été principalement établie pour des tensioactifs non ioniques de type polyoxyéthylénique. Selon cette échelle, les tensioactifs les moins hydrophiles, donc les moins solubles dans l'eau, ont une HLB proche de 0 ; à l'opposé, les tensioactifs les plus hydrophiles, donc les plus solubles dans l'eau, ont une HLB proche de 20. La valeur de la HLB permet de prévoir les propriétés et donc le domaine d'application du composé considéré (Tableau 2).

Tableau 2 : Relation entre valeur HLB et domaine d'application d'un composé

HLB	*Solubilité dans l'eau*	*Propriétés*
<1	Insolubles (ou solubles dans l'huile)	Produits non tensioactifs
2-3	Insolubles (ou solubles dans l'huile)	Antimoussants
4-6	Grossièrement dispersibles	Emulsifiants eau dans huile
7-9	Dispersion laiteuse	Mouillants
10-12	Dispersion translucide	Emulsifiants huile dans eau
13-15	Solubles	Détergents
15-20	Solubles	Solubilisants

Les valeurs de HLB peuvent être déterminées expérimentalement par des techniques variées (Brown *et al.*, 1956 ; Davies, 1957), ou estimées par différents calculs empiriques. Griffin a proposé ainsi de calculer la HLB des tensioactifs non ioniques suivant la formule :

$$\textbf{HLB} = \frac{\text{Masse molaire de la partie hydrophile}}{\text{Masse molaire totale}} \times 20$$

La comparaison des différents surfactifs à l'aide des HLB ne peut s'effectuer qu'au sein d'une même série. Par ailleurs, on peut noter que la HLB est une propriété additive et que la HLB d'un mélange de produits correspond à la moyenne pondérée des HLB de chacun des constituants du mélange.

I.3.2. EXEMPLES DE TENSIOACTIFS A PROPRIETES ANTIOXYDANTES REVELES DANS LA LITTERATURE

De plus en plus de travaux sont relatifs à la conception de tensioactifs fonctionnels apportant en plus de leurs propriétés tensioactives une propriété spécifique supplémentaire : antibactérien, complexant, antifongique,…. Ce type de tensioactifs permet d'obtenir des formulations appelées formulations bioactives (Rico-lattes, 2007).

Les tensioactifs antioxydants appartiennent à cette famille, mais les exemples sont relativement peu nombreux. Ils sont essentiellement utilisés dans les domaines de l'agro-alimentaire, de la cosmétique ou encore dans le domaine thérapeutique (Liao et Seib, 1988,1990 ; Silva et Maja Campos, 2000).

Le premier exemple correspond aux ascorbates d'alkyle, esters gras de l'acide ascorbique bien connus pour ses propriétés antioxydantes (Berg et Kiss, 1976 ; Deyoe *et al.*, 1976 ; Schrihatti et Nair, 1977 ; Bourgeois, 1981 ; Wang *et al.*, 1995 ; Atsunori *et al.*, 1995 ; Rosenblat *et al.*, 1999 ; Yan et Chen, 2003 ; Yamaguchi *et al.*, 2004). L'estérification se fait au niveau de l'alcool primaire de l'acide ascorbique avec un acide gras aliphatique saturé approprié (en général terpénique) en présence d'une quantité catalytique d'acide sulfurique (Takeda, 1984 ; Carlson, 1984 ; Takahiko *et al.*, 1993). Ces esters d'acide ascorbique sont aussi utilisés dans le domaine pharmaceutique pour la formulation de médicaments (Seib *et al.*, 1974,1978,1982,1992 ; Kondo et Shibata, 2008).

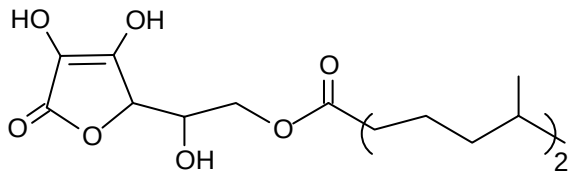
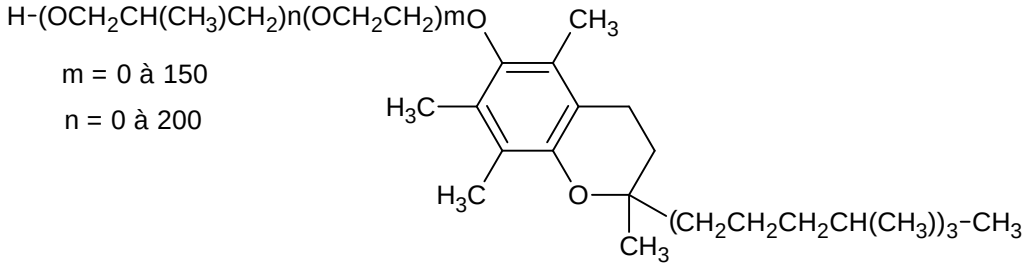


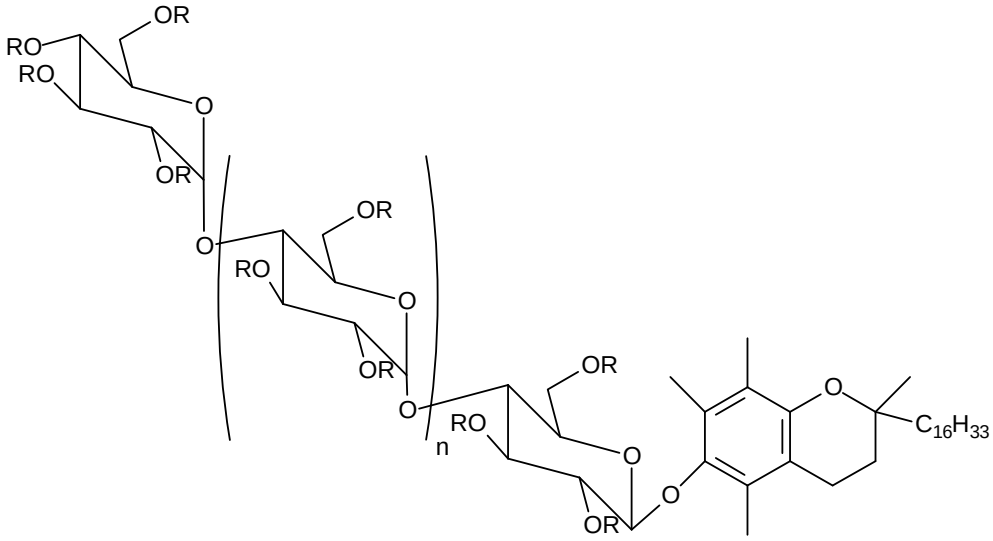
Figure 38. Ester gras de l'acide ascorbique

D'autres auteurs utilisent ces esters afin de transférer les propriétés antioxydantes particulières de la vitamine C dans des milieux lipophiles (Lee *et al.*, 2004). Ces composés ont la particularité de former une bicouche à la surface des composés alimentaires en milieu aqueux et de permettre ainsi une bonne protection contre l'oxydation des aliments en question (May *et al.*, 1996 ; Palma, 2002). Ils sont utilisés également dans le domaine de la cosmétique et de l'agroalimentaire (Martine *et al.*, 2003 ; Li, 2004).

Le deuxième cas est relatif à l'utilisation de la vitamine E comme module hydrophobe du tensioactif. Deux structures ont été relevées, l'une inclue un motif polyoxyéthylènique/polyoxypropylènique en tant que tête polaire (composé A), la deuxième correspond à un dérivé de polyglycosides (composés B) (Schneider, 1996 ; Kim *et al.*, 2002).



Composé A



Composés B

Figure 39. Exemples de tensioactif obtenus à partir de la vitamine E

Ces composés peuvent former des vésicules de la même manière que les tensioactifs bicaténaires et trouvent des applications dans le domaine de la cosmétique, de l'industrie pharmaceutique ou alimentaire.

Dans un autre exemple, une équipe américaine a relevé une activité antioxydante non négligeable de tensioactifs incorporant un motif polyoxyéthylènique (d'au moins 100 unités) en tant que tête polaire dont un exemple de structure est donné par la Figure 40 (Silvestre, 2000)**.**

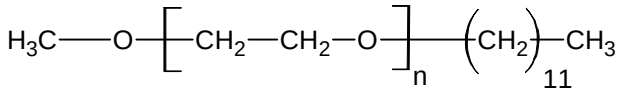


Figure 40. Exemple de tensioactif antioxydant non-ionique

Un troisième exemple de composés correspond à des dérivés amphiphiles de sels d'ammonium quaternaire pouvant présenter des propriétés antioxydantes et/ou pesticides en fonction de leur concentration trouvant des applications dans le domaine de la biologie (Figure 41) (Sarapuk, 2000 ; Kleszczynska *et al.*, 2000 ; Zabielska-Matejuk, 2005).

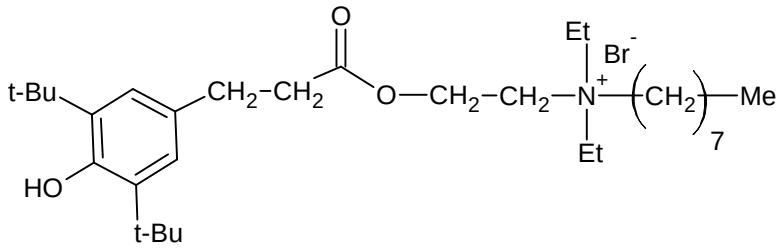


Figure 41. Exemple de tensioactif cationique antioxydant

Ces quelques exemples montrent que les travaux réalisés dans le domaine des tensioactifs antioxydants sont encore peu nombreux de manière générale. Dans tous les cas, aucune application n'a été révélée dans le domaine de la préservation du matériau bois.

Ainsi l'idée d'étudier des composés amphiphiles originaux présentant, outre leurs propriétés tensioactives, des propriétés antioxydantes qui pourraient à la fois servir à solubiliser le biocide organique par le biais d'une émulsion, mais aussi à renforcer son activité grâce aux propriétés antioxydantes, est une démarche qui apparaît originale. Ces tensioactifs nouveaux de type « 2 en 1 » pourraient de ce fait permettre de réduire les quantités de biocides nécessaires à la protection du bois et favoriser l'utilisation du matériau grâce à la mise en place de méthodes de préservation plus respectueuses de l'environnement.

MATERIELS ET METHODES

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. SYNTHESE

II.1.1. INDICATIONS GENERALES

Les produits et réactifs chimiques utilisés au cours de cette étude proviennent des sociétés Acros Organics (Noisy le grand, France) et Fluka-Sigma-Aldrich Chimie SARL, (St Quentin Fallavier, France).

Les produits industriels nous ont été gracieusement fournis par différentes sociétés :
- l'Irganox 1076 par Ciba Spécialités Chimiques (Ruel-Malmaison, France),
- l'Empilan NP 12 (alkyl phénol polyéthoxylé de formule HO-(C2H4O)n-(C6H4)C9H19) par HUNTSMAN (Saint Mihiel, France),
- le Simulsol 5815 S correspondant à tensioactif à base ricinoléate de glycérine éthoxylée et le Propiconazole par la société Dyrup (Albi, France),
- l'Estorob mélange d'esters d'acides gras insaturés contenant majoritairement du linoléate de méthyle (environ 75 %) par la société Novance (Compiègne, France),
- le chlorure de didecyldiméthylammonium (DDAC) par la société OBBIA (Aubazine, France).

Les solvants utilisés ont été soit acheté avec une pureté suffisante pour être utilisés directement, soit distillés avant utilisation : l'acétonitrile, le chloroforme, l'éthanol, l'éther, l'heptane, le méthanol et le toluène proviennent de Riedel De Haen et ont été utilisés sans autre purification ; l'acétate d'éthyle et l'hexane distillés directement ; le dichlorométhane distillés sur P_2O_5.

Les synthèses ont été réalisées sous hotte à l'aide d'agitateurs magnétiques chauffants IKALABOTECHNK RCT basic.

Les points de fusion (PF) ont été mesurés à l'aide d'un banc de KOFLER.

Les distillations sous vide ont été réalisés à l'aide d'un four à boules BUCHI Glass Oven B-585 relié à une pompe à palette.

Les spectres RMN ^1H en phase liquide sont effectués sur des spectromètres Bruker AC-200 et Drx-400 à des fréquences de résonance de 200 et 400 MHz respectivement. Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) avec le tétraméthylsilane comme référence interne. Les abréviations suivantes ont été utilisées pour décrire les différents signaux : s pour singulet, d pour doublet, t pour triplet et m pour multiplet. Différents solvants deutérés ont été utilisés suivant la solubilité des composés à analyser. Leur nature exacte est précisée dans chaque cas.

Les spectres Infra Rouge ont été réalisés sur un spectromètre PERKIN-ELMER 1600 FTIR soit sous forme de film entre deux plaques de NaCl pour les composés liquides, soit sous forme de pastilles de KBr pour les produits solides. Les valeurs sont données en cm^{-1}.

Les microanalyses ont été effectuées sur un appareil Thermofinnigan FlashEA 1112.

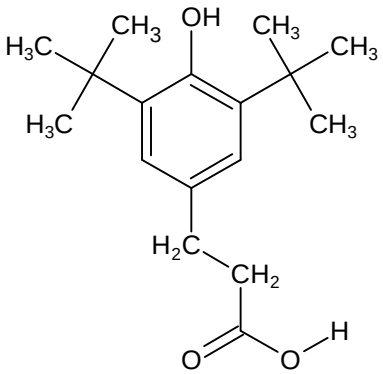
II.1.2. SYNTHESE DES COMPOSES AMPHIPHILES PRESENTANT UN MOTIF PHENOL ENCOMBRE

II.1.2.1. Synthèse de l'acide-3-(3,5-di-ter-butyl-4-hydroxyphényl)-propionique

10 grammes d'Irganox 1076 (1 équivalent) sont mélangés dans un ballon de 250 mL à 3,01 g de NaOH (4 équivalents) dissous dans un mélange méthanol/eau (90 mL/10 mL). Le mélange est chauffé à reflux sous agitation magnétique pendant 16 heures.

Après refroidissement et évaporation du méthanol, le résidu est repris à l'eau (100 mL). La phase aqueuse qui doit être basique est lavée avec 100 mL de dichlorométhane puis acidifiée à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (3 N) jusqu'à un pH égal à 3-2 avant d'être extraite 2 fois avec 100 mL de dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont alors séchée sur $MgSO_4$, filtrées sur Büchner puis le solvant évaporé sous vide.

Caractéristiques du composé **1**.



Rendement : 95 %.

Aspect : solide jaune ; PF (°C) : 145-172, $PF_{théorique}$ = 171 °C.

IR ν (cm^{-1}) : 3626 à 3423 (O-H) ; 2956 à 2846 ($CH_{aliphatique}$) ; 1706 (C=O) ; 1432 (C=C).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,43 (s, 18H) ; 2,65 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 2,88 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 5,08 (s, 1H) ; 7,00 (s, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 30,86 ; 36,76 ; 42,03 ; 96,86 ; 125,5 ; 131,24 ; 136,72 ; 152,96 ; 179,95.

II.1.2.2. Estérification de l'acide-3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxy-phényl)-propionique

Les tensioactifs portant un motif 2,6-diterbutyl-4-méthyl phénol s'obtiennent par estérification de l'acide-3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxy-phényl)-propionique par différents polyéthylènes glycols. Deux modes opératoires ont été utilisés pour l'obtention respectivement des monoesters ou des diesters.

a) Synthèse des monoesters de PEG

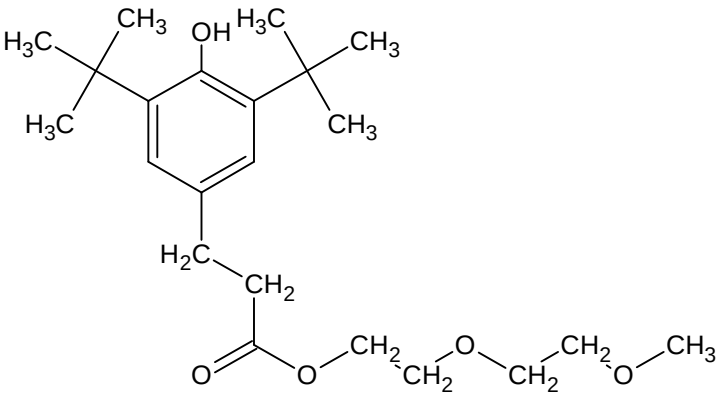
La synthèse des monoesters est réalisée de la manière suivante : 0,73 g d'acide 3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxy-phényl)-propionique sont placés dans un ballon de 250 mL équipé d'un Dean Stark et d'un réfrigérant en présence d'une quantité catalytique d'acide p-toluènesulfonique (APTS) comme catalyseur et de 10 équivalents de polyéthylène glycol dans 100 mL de toluène. Le mélange est porté à reflux durant 24 heures. Après évaporation du toluène, le résidu est repris avec 30 mL de dichlorométhane puis lavé avec une solution saturée de bicarbonate de sodium puis à l'eau pour éliminer l'excès de PEG. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée, puis le solvant éliminé sous vide.

b) Synthèse des diesters de PEG

Pour l'obtention des diesters, les conditions expérimentales restent les mêmes que précédemment à l'exception des quantités de réactifs utilisés: l'acide-3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxy-phényl)-propionique est utilisé en excès par rapport au polyéthylène glycol à raison de 2,5 équivalents d'acide pour 1 équivalent de PEG.

Caractéristiques des monoesters.

Composé **2a**.



Rendement: 100 %.

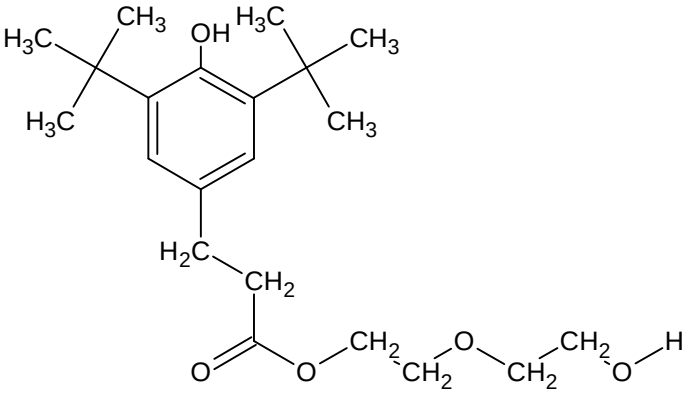
Aspect : liquide brun.

IR ν (cm^{-1}) : 3429 (O-H) ; 2951 ($CH_{aliphatique}$) ; 1734 (C=O) ; 14211 (C=C) ; 1191 (C-O).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,45 (s, 18H) ; 2,65 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 2,85 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 3,4 (s, 3H) ; 3,62 (m, 6H) ; 4,25 (t, ^{3}J = 3 Hz, 2H) ; 6,95 (s, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 30,49 ; 34,91 ; 37,03 ; 59,59 ; 64,02 ; 69,71 ; 70,97 ; 72,45 ; 125,59 ; 173,67.

Composé **2b**.



Rendement: 96 %.

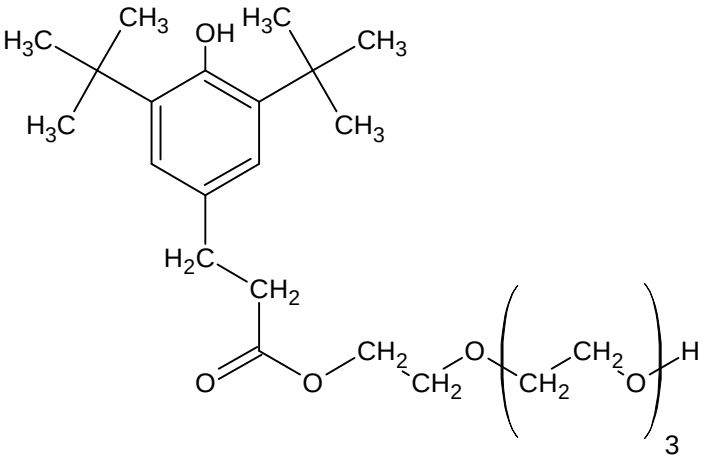
Aspect : liquide brun.

IR ν (cm^{-1}) : 3637 à 3439 (O-H) ; 2956 ($CH_{aliphatique}$) ; 1731 (C=O) ; 1434 (C=C) ; 1130 et 1064 (C-O).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,43 (s, 18H) ; 2,65 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 2,87 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 3,60 (m, 2H) ; 3,73 (m, 4H) ; 4,20 (t, ^{3}J = 3 Hz, 2H) ; 5,08 (m, 1H) ; 6,98 (s, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 31,33 ; 34,91 ; 36,82 ; 62,12 ; 69,71 ; 72,87 ; 125,59 ; 173,67.

Composé **2c**.



Rendement: 99 %.

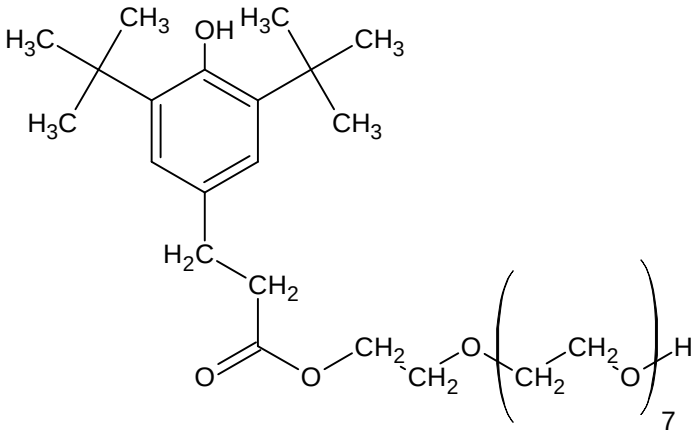
Aspect : liquide brun.

IR ν (cm^{-1}) : 3637 à 3456 (O-H) ; 2962 et 2868 ($CH_{aliphatique}$) ; 1731 (C=O) ; 1435 (C=C) ; 1122 (C-O).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,44 (m, 18H) ; 2,64 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 2,87 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 3,68 (m, 14H) ; 4,26 (s, 2H) ; 6,99 (s, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 30,7 ; 34,91 ; 37,03 ; 61,07 ; 62,12 ; 69,71 ; 72,87 ; 125,59 ; 131,49 ; 136,56 ; 152,59 ; 173,88.

Composé **2d** (PEG400).



Rendement: 56 %.

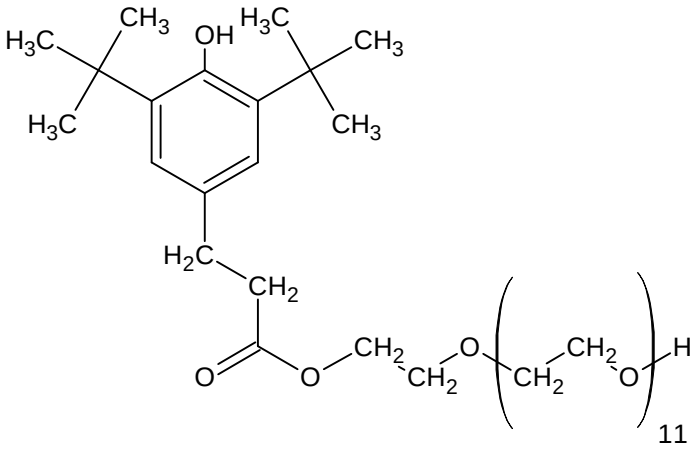
Aspect : solide brun ; PF (°C) : 56-62.

IR ν (cm^{-1}) : 3395 (OH) ; 2901 ($CH_{aliphatique}$) ; 1728 (C=O) ; 1465 (C=C) ; 1100 (C-O).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,42 (s, 18H) ; 2,62 (t, ^{3}J = 5Hz, 2H) ; 2,86 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 3,64 (s, 30H) ; 4,42 (s, 2H) ; 6,98 (s, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 30,01 ; 31,06 ; 61,22 ; 69,02 ; 72,82 ; 124,48 ; 138,189 ; 152,5 ; 173,68.

Composé **2e** (PEG600).



Rendement : 60 %.

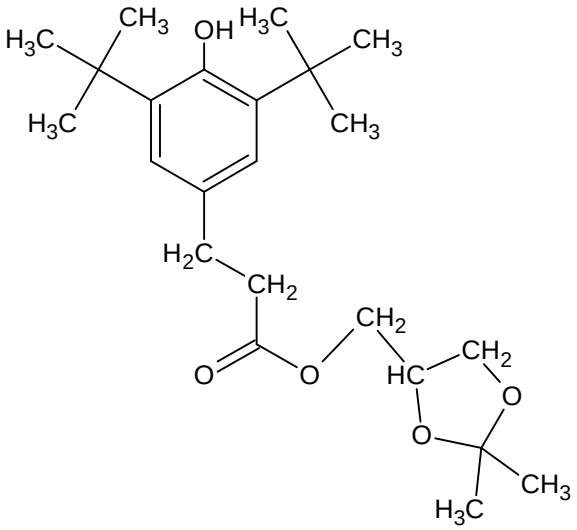
Aspect : solide brun ; PF (°C) : 56-60.

IR ν (cm^{-1}) : 3434 (O-H) ; 2912 et 2874 ($CH_{aliphatique}$) ; 1734 (C=O) ; 1470 (C=C) ; 1111 (C-O).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,25 (m, 18H) ; 2,62 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 2,86 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 3,64 (s, 46H) ; 4,42 (m, 2H) ; 6,98 (s, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 30,91 ; 34,70 ; 62,12 ; 63,81 ; 70,97 ; 72,87 ; 125,17 ; 136,35 ; 152,5 ; 173,664.

Composé **2f** (Solketal).



Rendement : 100%.

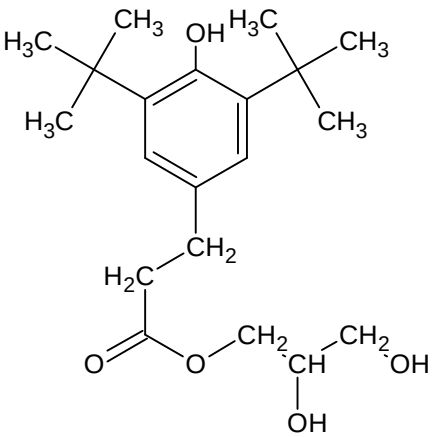
Aspect : Liquide brun.

IR ν (cm^{-1}) : 3450 (O-H) ; 2950($CH_{aliphatique}$) ; 1737 (C=O) ; 1435 (C=C) ; 1119 (C-O).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,37 (s, 6H) ; 1,44 (m, 18H) ; 2,46 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 2,65 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 3,78 (m, 2H) ; 4,03 (t, ^{3}j= 3Hz, 1H) ; 4,24 (s, 2H) ; 6,98 (s, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 25,85 ; 27,32 ; 30,91 ; 35,12 ; 63,17 ; 66,34 ; 74,35 ; 125,17 ; 152,70 ; 173,66.

Composé **2g** (Glycerol).



Rendement: 99.8%.

Aspect : Liquide brun.

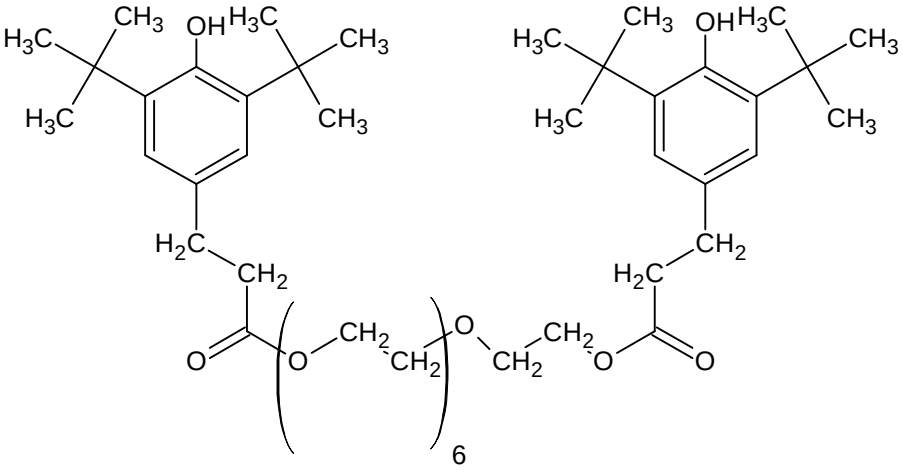
IR ν (cm^{-1}) : 3413 (O-H) ; 2956 ($CH_{aliphatique}$) ; 1731 (C=O) ; 1567 et 1435 (C=C).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,42 (s, 18H) ; 2,55 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 2,65 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H) ; 3,62 (m, 2H) ; 4,15 (t, ^{3}j= 3Hz, 1H) ; 4,24 (s, 2H) ; 6,98 (s, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 30,91 ; 34,91 ; 36,81 ; 63,38 ; 65,14 ; 71,34 ; 125,17 ; 152,70 ; 173,66.

Caractéristiques des composés diesters.

Composé **3a**.



Rendement: 100 %.

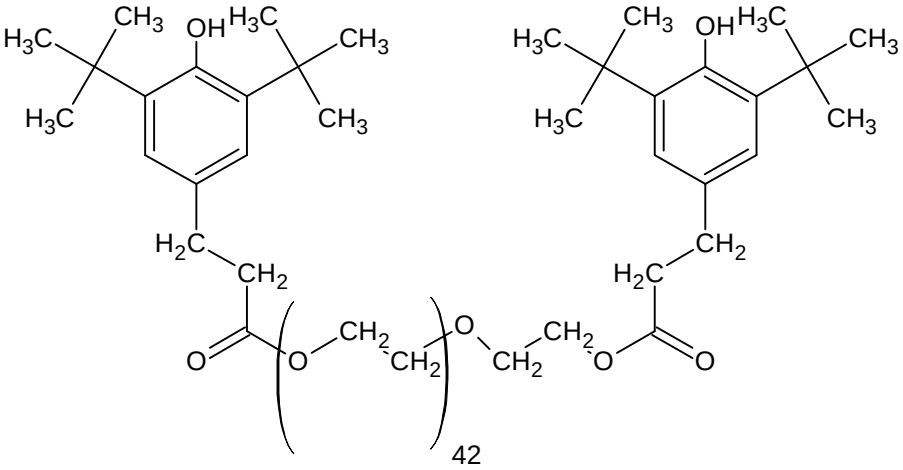
Aspect : liquide brun.

IR ν (cm^{-1}) : 3632 (O-H) ; 2956 ($CH_{aliphatique}$) ; 1731 (C=O) ; 1440 (C=C) ; 1119 (C-O).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,42 (m, 36H) ; 2,62 (t, ^{3}J = 5 Hz, 4H) ; 2,64 (t, ^{3}J = 5 Hz, 4H) ; 3,64 (s, 26H) ; 4,24 (t, ^{3}J = 3 Hz, 4H) ; 6,98 (s, 4H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 30,70 ; 34,70 ; 53,89 ; 70,97 ; 125,75 ; 129,81 ; 152,50 ; 173,66.

Composé **3b** (PEG4000).



Rendement : 94 %.

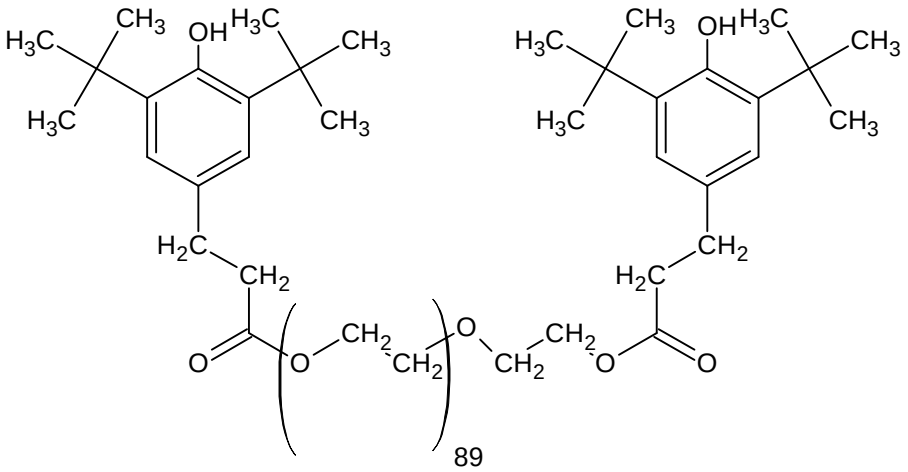
Aspect : solide blanc clair ; PF (°C) : 60-62.

IR ν (cm^{-1}) : 3445 (O-H) ; 2879 ($CH_{aliphatique}$) ; 1731 (C=O) ; 1465 (C=C) ; 1108 (C-O).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,42 (s, 36H) ; 2,61 (t, ^{3}J = 5 Hz, 4H) ; 2,64 (t, ^{3}J = 5 Hz, 4H) ; 3,64 (s, 168H) ; 4,24 (t, ^{3}J = 3 Hz, 4H) ; 6,98 (s, 4H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 30,70 ; 34,70 ; 53,89 ; 70,97 ; 125,75 ; 129,81 ; 152,50 ; 173,66.

Composé **3c** (PEG10000).



Rendement : 99 %.

Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 58-62.

IR ν (cm^{-1}) : 3461 (O-H) ; 2907 ($CH_{aliphatique}$) ; 1732 (C=O) ; 1468 (C=C) ; 1243 (C-O).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,42 (s, 36H) ; 2,62 (t, ^{3}J = 5,5Hz, 4H) ; 2,86 (t, ^{3}J = 5,5Hz, 4H) ; 3,65 (s, 356H) ; 4,24 (t, ^{3}J = 5,5Hz, 4H) ; 6,98 (s, 4H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 30,91 ; 32,00 ; 70,76 ; 157,02 ; 158,27 ; 169,24 ; 180,63.

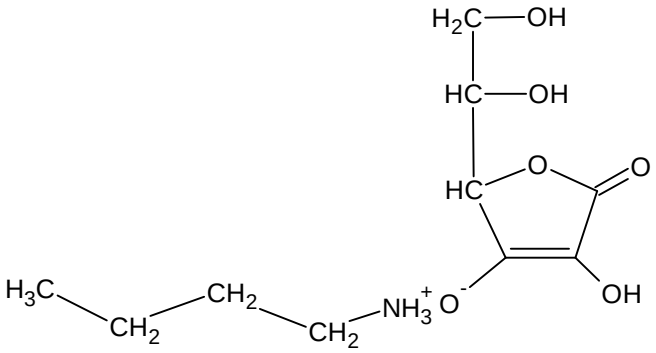
II.1.3. SYNTHESE DES COMPOSES AMPHIPHILES A PARTIR DE L'ACIDE ASCORBIQUE

II.1.3.1. Réaction de l'acide ascorbique et d'une amine grasse (AaCn)

Dans un ballon tricol de 250 mL, 2 g d'acide ascorbique sont mélangés avec un équivalent molaire d'amine grasse, l'ensemble est solubilisé dans une solution eau/méthanol (1/3) (v/v). Le mélange est maintenu sous azote sous forte agitation durant 4 heures, à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé sous vide et le résidu solide obtenu lavé avec un mélange diéthyléther/méthanol (6/4) (v/v) puis séché sous vide dans un dessiccateur en présence de silicagel

durant 24 heures. L'ascorbate de N-alkyl-ammonium obtenu est identifié avec le code AaC_n où n représente le nombre d'atomes de carbone de la chaîne grasse de l'amine et Aa correspond à la partie acide ascorbique. Seul le composé **4d** (AaC_{12}) a fait l'objet des essais de formulations ultérieurs.

Composé **4a** (AaC_4).



Rendement : 100 %.

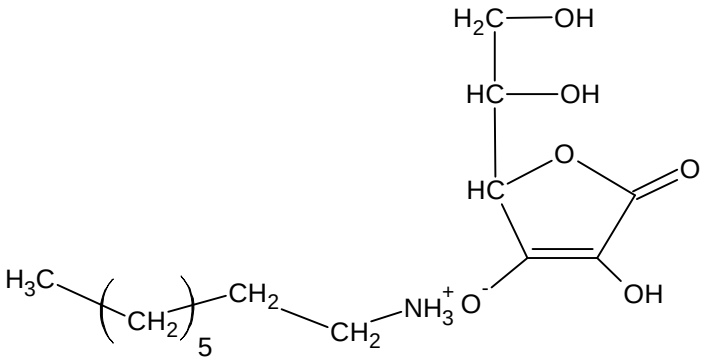
Aspect : visqueux brun.

IR ν (cm^{-1}) : 3300 à 3100 (OH et NH_3^+) ; 2956 et 2870 ($CH_{aliphatique}$) ; 1720 (C=O) ; 1652 (C-N) ; 1465 (C=C) ; 1370 (COO^-).

RMN ^1H (méthanol D_4) δ (ppm) : 0,90 (t, ^3j = 6,5 Hz, 3H) ; 1,40 (m, 2H) ; 1,65 (m, 2H) ; 2,90 (t, ^3J = 8 Hz, 2H) ; 3,40 (d, ^2J = 3 Hz, 1H) ; 3,94 (m, 1H) ; 3,70 et 3,87 (2dd, ^3J = 6,55 Hz, ^2J = 3 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (méthanol D_4) δ (ppm) : 15,01 ; 30,8 ; 33,7 ; 41,56 ; 63,9 ; 69,90 ; 78,90 ; 120,00 ; 175,90 ; 179,00.

Composé **4b** (AaC_8).



Rendement : 100 %.

Aspect : solide brun clair ; PF (°C) : 65.

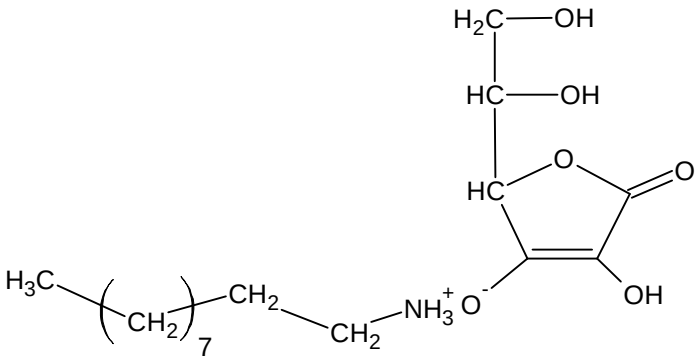
IR ν (cm^{-1}) : 3390 à 3100 (OH et NH_3^+) ; 2920 et 2850 ($CH_{aliphatique}$) ; 1725 (C=O) ; 1591 (C-N) ; 1465 (C=C) ; 1390 (COO^-).

RMN ^1H (méthanol D_4) δ (ppm) : 0,90 (t, ^3J = 6.5 Hz, 3H) ; 1,31 (m, 10H) ; 1,65 (m, 2H) ; 2,90 (t, ^3J = 8 Hz, 2H) ; 4,40 (d, ^2J = 3 Hz, 1H) ; 3,94 (m, 1H) ; 3,70 et 3,87 (2 dd, ^3J = 6,55 Hz, ^2J = 3 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (méthanol D_4) δ (ppm) : 14,24 ; 23,73 ; 27,52 ; 29,00 ; 30,06 ; 33,00 ; 40,60 ; 64,43 ; 73,49 ; 80,03 ; 115,25 ; 174,93 ; 178.

Microanalyse : attendue C (55,33), H (8,61), N (4,68) ; déterminée C (55,07), H (8,91), N (4,59)

Composé **4c** (AaC_{10}).



Rendement : 100 %.

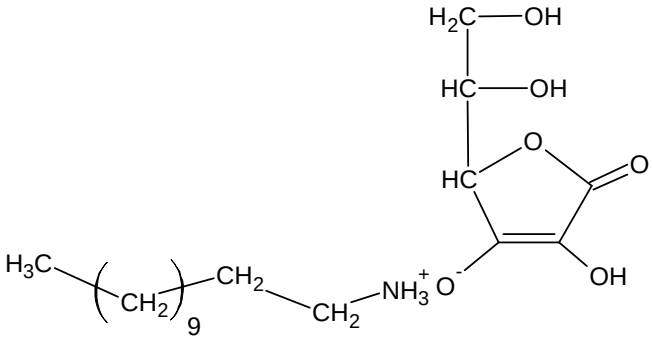
Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 67-68.

IR ν (cm^{-1}) : 3390 à 3200 (OH et NH_3^+) ; 2917 et 2850 ($CH_{aliphatique}$) ; 1720 (C=O) ; 1514 (C-N).

RMN ^1H (méthanol D_4) δ (ppm) : 0,90 (t, ^3J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,30 (m, 14H) ; 1,65 (m, 2H), 2,90 (t, ^3J = 8 Hz, 2H) ; 3,80 et 3,81 (2dd, ^3J = 6,55 Hz, ^2J = 3 Hz, 2H) ; 4,40 (d, ^2J = 3 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (Méthanol D_4) δ (ppm) : 14,82 ; 24,23 ; 28,07 ; 29,80 ; 30,76 ; 33,45 ; 41,52 ; 64,76 ; 74,00 ; 80,52 ; 115,87 ; 175,41 ; 178,68.

Composé **4d** (AaC_{12}).



Rendement : 99 %.

Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 68.

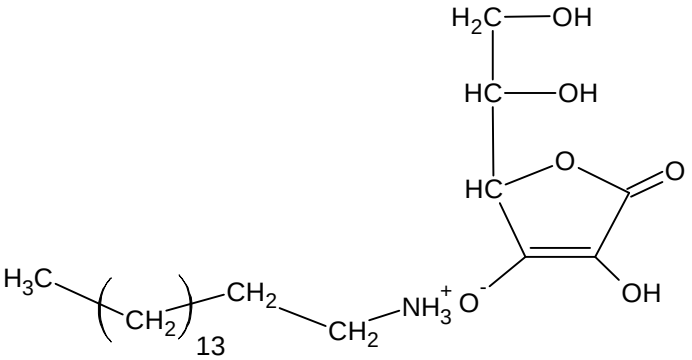
IR ν (cm^{-1}) : 3400 à 3100 (OH et NH_3^+) ; 2950 et 2851 ($CH_{aliphatique}$) ; 1731 (C=O) ; 1465 (C-C) ; 1377 (COO^-).

RMN ^1H (méthanol D_4) δ (ppm) : 0,90 (t, ^3J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,31 (m, 18H) ; 1,60 (m, 2H) ; 2,94 ppm (t,^3J = 8 Hz, 2H) ; 4,40 ppm (d, ^2J = 3 Hz, 1H) ; 3,94 ppm (m, 1H) ; 3,85 et 3,87 (2dd, ^3J = 6,55 Hz, ^2J = 3 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (méthanol D_4) δ (ppm) : 15,03 ; 24,32 ; 28,11 ; 29,16 ; 31,48 ; 33,59 ; 41,40 ; 64,80 ; 72,39 ; 80,41 ; 115,84 ; 174,67 ; 178,46.

Microanalyse : attendue C (60,57), H (9,59), N (4,15) ; déterminée C (59,81), H (9,76), N (3,87).

Composé **4e** (AaC_{16}).



Rendement : 99 %.

Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 69.

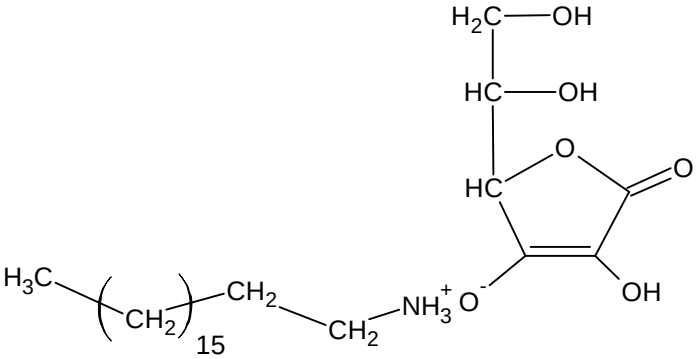
IR ν (cm^{-1}) : 3400 à 3100 (OH et NH_3^+) ; 2917 et 2846 ($CH_{aliphatique}$) ; 1720,2 (C=O) ; 1577,5 (C-N) ; 1467 (C-C).

RMN ^1H (méthanol D_4) δ (ppm) : 0,89 (t, ^3J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,31 (m, 26H) ; 1,67 (m, 2H), 2,93 (t, ^3J = 8 Hz, 2H) ; 4,40 (d, ^2J = 3 Hz, 1H) ; 3,80 (m, 1H) ; 3,69 (t, ^3J = 6,55 Hz, 2H).

RMN ^{13}C (méthanol D_4) δ (ppm) : 14,37 ; 23,75 ; 27,29 ; 28,53 ; 30,65 ; 32,95 ; 40,56 ; 64,09 ; 74,18 ; 79,49 ; 97,19 ; 171,16 ; 177,24.

Microanalyse : attendue C (63,12), H (10,28), N (3,36) ; déterminée C (63,28), H (10,38), N (3,35).

Composé **4f** (AaC_{18}).



Rendement : 98 %.

Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 70.

IR ν (cm^{-1}) : 3400 à 3100 (OH et NH_3^+) ; 2900 et 2800 ($CH_{aliphatique}$) ; 1720 (C=O) ; 1577 (C-N) ; 1470 (C-C).

RMN ^1H (méthanol D_4) δ (ppm) : 0,90 (t, ^3J = 6.5 Hz, 3H) ; 1,31 (m, 30H) ; 1,60 (m, 2H) ; 2,94 (t, ^3J = 8 Hz, 2H) ; 4.40 (d, ^2J = 3 Hz, 1H) ; 3,94 (m, 1H) ; 3,70 (t, ^3J = 6,55 Hz, 2H).

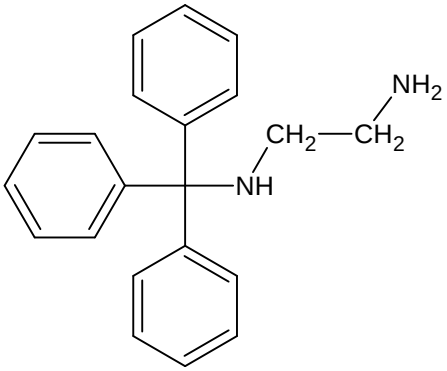
RMN ^{13}C (méthanol D_4) δ (ppm) : 15,217 ; 24,00 ; 28,31 ; 29,38 ; 30,98 ; 33,67 ; 41,56 ; 65,00 ; 74,00 ; 80,00 ; 120,00 ; 178,00 ; 180,00.

Microanalyse : attendue C (65,07), H (10,69), N (3,76) ; déterminée C (64,69), H (10,63), N (3,14).

II.1.3.2. Synthèse de tensioactifs bimodulaires dérivés d'acide gras (AaEdCn)

a) Monotritylation de l'éthylène diamine

Ce mode opératoire dérive de celui utilisé par Malgesini en 2003. Dans un ballon tricol, 10 g d'éthylène diamine (soit 13 éq.) sont solubilisés dans 10 mL de chloroforme et maintenus sous forte agitation à une température comprise entre 5 et 10°C durant 15 minutes. Sont alors additionnés, goutte à goutte, 1 équivalent molaire de chlorure de triphényleméthane (soit 3,59 g) solubilisés dans 50 mL de chloroforme, durant 1 heure jusqu'à ce que la température du milieu réactionnel atteigne celle de la pièce. Le solvant est éliminé par évaporation et le produit repris dans 50 mL d'éther. Une série de lavages est effectuée avec 30 mL d'eau distillée et 20 mL de NaCl (saturé) puis la phase organique est séchée au $MgSO_4$ et le solvant est évaporé sous vide à 30°C. Le produit **5** obtenu se présente sous forme de solide jaune.



Rendement : 56 %.

Aspect : solide jaune ; PF (°C) : 66, $PF_{théorique}$ = 68-69°C.

IR ν (cm^{-1}) : 3082 à 3027 (NH) ; 2917 et 2851 ($CH_{aliphatique}$) ; 1593 (C=C) ; 1486 et 1445 (C-N) ; 705 ($CH_{aromatique}$).

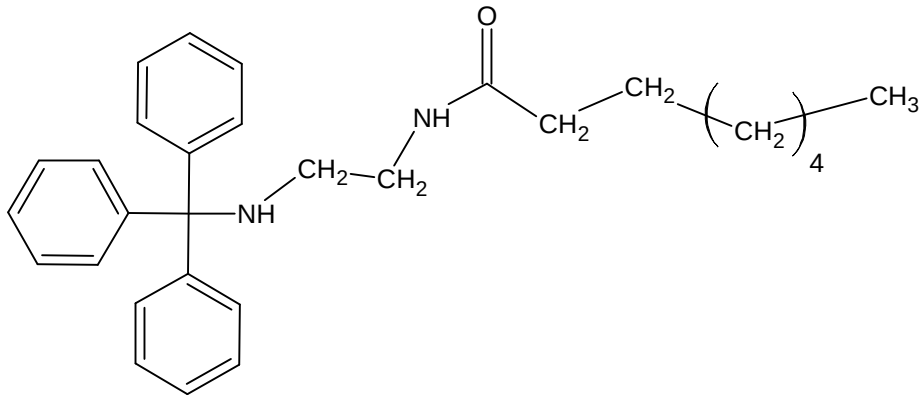
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,23 (s, NH2) ; 2,20 (t, ^{3}J = 5Hz, 2H) ; 2,78 (t, ^{3}J = 5Hz, 2H) ; 7,26 (m, 8H) ; 7,47 (m, 7H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 44,35 ; 47,15 ; 71,19 ; 125,00 ; 128,12 ; 146,68.

b) Couplage de l'éthylène diamine monotritylée avec un acide gras

Dans un ballon de 250 mL, 10 mmoles d'acide gras sont dissoutes dans 50 mL d'acétonitrile, sous agitation magnétique. Puis sont ajoutées 10 mmoles de BOP (1 éq.; 4,42 g), 20 mmoles de triéthylamine (2 éq. ; 2,02 g) et enfin 10 mmoles du composé **5** (1 éq.). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 15 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite, un liquide visqueux de couleur orange est obtenu. Il est dissous dans 30 mL d'acétate d'éthyle. Cette phase organique est lavée successivement par 20 mL d'une solution d'HCl 0,1 N ; 20 mL de solution saturée de $NaHCO_3$ puis deux fois par 20 mL de solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et le solvant évaporé. Le produit **6** obtenu se présente sous forme de solide blanc.

Composé **6a**.



Rendement : 97 %.

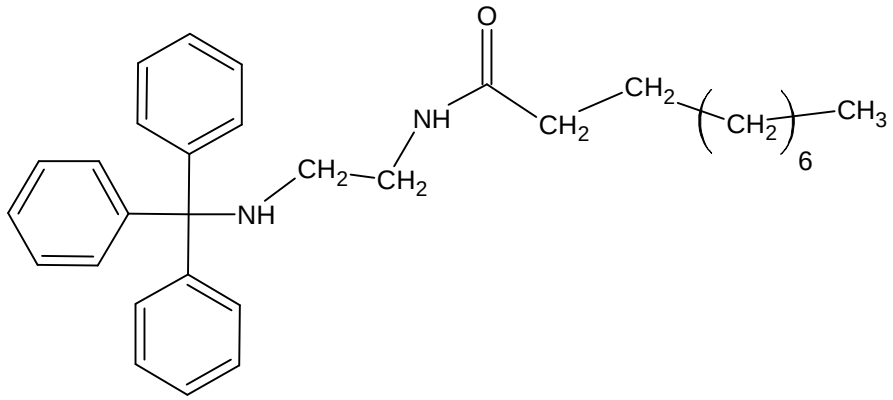
Aspect : solide jaune ; PF (°C) : 26-40.

IR ν (cm^{-1}) : 3428 à 3297 (NH) ; 2923 et 2852 ($CH_{aliphatique}$) ; 1737 et 1627 (C=O) ; 1572 (N-C) ; 1492 (C-C) ; 700 ($CH_{aromatique}$).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 0,87 (t, ^{3}J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,25 (m, 8H) ; 1,70 (m, 2H) ; 2,15 (t, ^{3}J = 5 Hz, 2H); 2.35 (d, ^{2}J = 14 Hz, 2H) ; 3.32 (t, ^{3}J = 10 Hz, 2H) ; 7,25 (t,^{3}J = 2Hz, 8H) ; 7,40 (d, ^{2}J = 7,5 Hz, 7H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 14,55 ; 23,04 à 37,67 ; 40,64 et 44,04 ; 71,14 ; 66,55 ; 127,79 à 129,95 ; 147,15 ; 174,45.

Composé **6b**.



Rendement : 97,7 %.

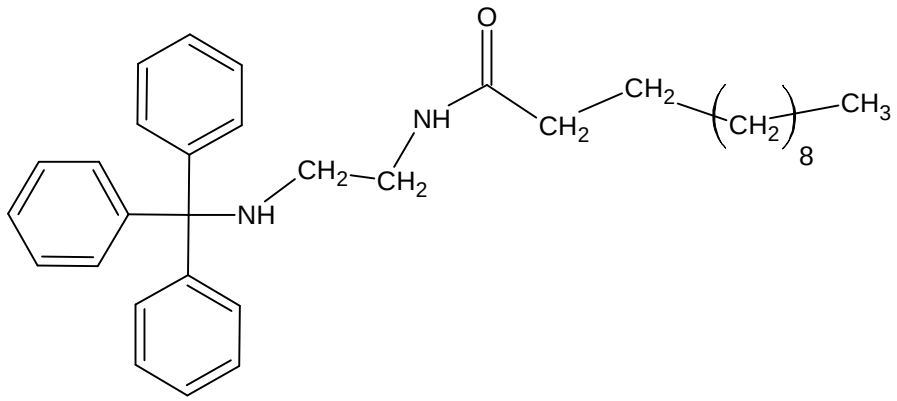
Aspect : solide jaune ; PF (°C) : 41-43.

IR ν (cm^{-1}) : 3434 à 3297 (NH) ; 2917 et 2852 ($CH_{aliphatique}$) ; 1627 (C=O) ; 1569 (C-N) ; 1498 (C-C) ; 702 ($CH_{aromatique}$).

RMN ^1H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 0,87 (t, ^3J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,30 (m, 12H) ; 1,65 (d, ^2J = 6 Hz, 2H) ; 1,70 (m, 2H) ; 2,20 (t, ^3J = 5 Hz, 2H) ; 3,00 (d, ^2J = 14 Hz, 2H) ; 3.30 (t, ^3J = 10 Hz, 2H) ;) ; 7,30 (t,^3J = 2Hz, 8H) ; 7,45 (d, ^2J = 7,5 Hz, 7H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 14,34 ; 23,25 à 37,67 ; 40,43 ; 44,25 ; 71,62 ; 127,63 à 129,59 ; 147,37 ; 174,47.

Composé **6c**.



Rendement : 98 %.

Aspect : solide jaune clair ; PF (°C) : 43.

IR ν (cm^{-1}) : 3302 à 3247 (NH) ; 2918 et 2846 ($CH_{aliphatique}$) ; 1742 et 1627 (C=O) ; 1572 (C-N) ; 1492 (C-C) ; 702 ($CH_{aromatique}$).

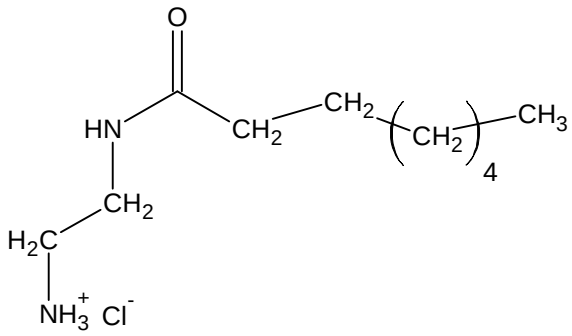
RMN ^1H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 0,80 (t, ^3J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,20 (m, 16H) ; 1,55 (d, ^2J = 6 Hz, 2H) ; 1,68 (m, 2H) ; 2,24 (t, ^3J = 5 Hz, 2H) ; 3,02 (d, ^2J = 14 Hz, 2H) ;) ; 7,12 (t,^3J = 2Hz, 8H) ; 7,37 (d, ^2J = 7,5 Hz, 7H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 14,67 ; 23,11 à 37,44 ; 45,46 ; 48,2 ; 62,12 ; 66,55 ; 127,7 à 129,39 ; 139,51 ; 147,52 ; 177,46.

c) Déprotection du groupement trityle

Le composé **6** est repris dans une solution d'acide chlorhydrique 12N / acétonitrile (3/4) (v/v). Le mélange est agité durant 3 heures à température ambiante. Les solvants sont éliminés sous pression réduite, puis le solide blanc amorphe obtenu est recristallisé dans l'hexane pour donner le composé **7**.

Composé **7a**.



Rendement : 98 %.

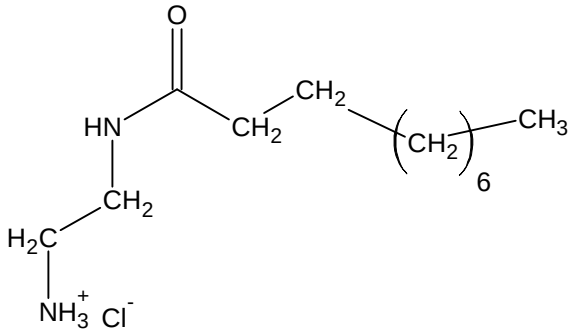
Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 16-20.

IR ν (cm^{-1}) : 3242 à 3220 (NH) ; 2923et 2852 ($CH_{aliphatique}$) ; 1687 et 1654 (C=O) ; 1553 (C-N) ; 1456 et 1399 (C-C).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 0,89 (t, ^{3}J= 6,5 Hz, 3H) ; 1,29 (m, 8H) ; 1,36 (t, ^{3}J = 4 Hz, 2H) ; 1.22 (t, ^{3}J = 7,8 Hz, 2H) ; 3,04 (t, ^{3}J = 4 Hz, 2H) ; 3,40 (t, ^{3}J = 4Hz, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 15,13 ; 20,86 à 30,83 ; 33,58 ; 37,83 ; 40,86 ; 181,68.

Composé **7b**.



Rendement : 98,5 %.

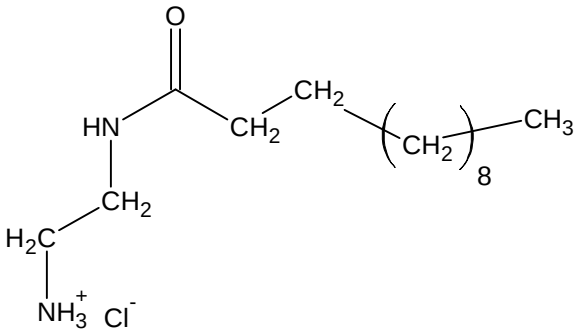
Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 30-32.

IR ν (cm^{-1}) : 3291 à 3082 (NH) ; 2928 ($CH_{aliphatique}$) ; 1651 (C=O) ; 1553 (C-N) ; 1468 (C-C).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 0,90 (t, ^{3}J= 6,5 Hz, 3H) ; 1,30 (m, 12H) ; 1,60 (t, ^{3}J = 4 Hz, 2H) ; 2,25 (t, ^{3}J = 7,8 Hz, 2H) ; 3,07 (t, ^{3}J = 4 Hz, 2H) ; 3,47 (t, ^{3}J = 4Hz, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 15,13 ; 24,47 à 37,41 ; 38,68 ; 171,10 ; 178,30.

Composé **7c**.



Rendement : 99 %.

Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 31-32.

IR ν (cm^{-1}) : 3296 à 3214 (NH) ; 2918 et 2846 ($CH_{aliphatique}$) ; 1646 (C=O) ; 1553 (C-N) ; 1468 (C-C).

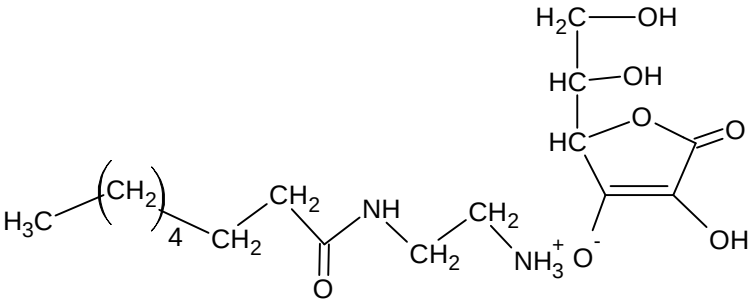
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 0,90 (t, ^{3}J= 6,5 Hz, 3H) ; 1,29 (m, 16H) ; 1,61 (t, ^{3}J = 4 Hz, 2H) ; 2,23 (t, ^{3}J = 7,8 Hz, 2H) ; 3,04 (t, ^{3}J = 4 Hz, 2H) ; 3,40 (t, ^{3}J = 4Hz, 2H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 14,50 ; 23,57 à 33,05 ; 36,85 ; 38,12 ; 40,86 ; 177,30.

d) Réaction avec l'acide ascorbique

Le composé **7** est repris dans une ampoule à décanter avec 50 mL d'éther éthylique puis lavé successivement avec 20 mL de Na_2CO_3 puis 20 mL de NaCl. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis le solvant évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu est re-solubilisé dans 15 mL de méthanol puis mis à réagir avec 1 équivalent molaire de d'acide ascorbique dissous dans un mélange eau/méthanol (1/9) (v/v). La réaction est laissée sous forte agitation à température ambiante durant 1 heure. Le solvant est éliminé sous vide et le résidu solide obtenu séché au dessicateur. Le produit obtenu porte le code AaEdCn où Aa représente la partie antioxydante correspondant à l'acide ascorbique et n le nombre d'atomes de carbone porté par l'acide gras condensé sur l'éthylène diamine.

Composé **8a** ($AaEdC_8$).



Rendement : 99 %.

Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 96-97.

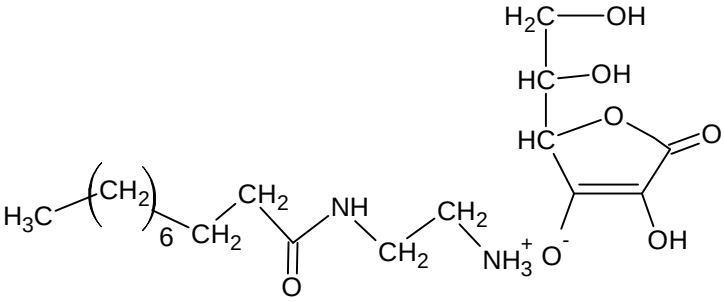
IR ν (cm^{-1}) : 3522 à 3120 (OH et NH_3^+) ; 2918 et 2852 ($CH_{aliphatique}$) ; 1753 et 1674 (C=O) ; 1553 (C=C) ; 1454 et 1399 (C-C).

RMN ^1H (méthanol D_4) δ (ppm) : 0,91 (t, ^3J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,18 (m, 8H) ; 1,60 (m, 2H) ; 2,23 (t, ^3J = 8 Hz, 2H) ; 3,04 (t, ^3J = 6 Hz, 2H) ; 3,43 (t, ^3J = 6 Hz, 2H) ; 3,68 (d, ^2J = 6,79 Hz, 2H) ; 3,89 (t, ^3J = 3 Hz, 1H) ; 4,79 (s, 1H).

RMN ^{13}C (méthanol D_4) δ (ppm) : 14,82 ; 21,57 ; 24,1 ; 27,06 ; 30,42 ; 33,18 ; 38,66 ; 41,40 ; 64,17 ; 70,92 ; 90,74 ; 97,49 ; 120,26 ; 155,06 ; 174,04 ; 178,26.

Microanalyse pour $C_{16}H_{30}N_2O_7$: attendue C (41,15), H (6,18), N (8) ; déterminée C (40,8), H (5,75), N (8).

Composé **8b** ($AaEdC_{10}$).



Rendement : 99,5 %.

Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 97-98.

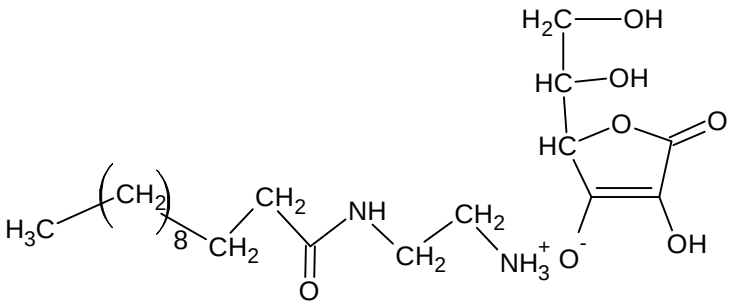
IR ν (cm^{-1}) : 3522 à 3126 (OH et NH_3^+) ; 2918 et 2852 ($CH_{aliphatique}$) ; 1753 et 1673 (C=O) ; 1553 (C-N) ; 1498 et 1320 (C-C).

RMN ^1H (méthanol D_4) δ (ppm) : 0,90 (t, ^3J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,28 (m, 12H) ; 1,60 (m, 2H) ; 2,24 (t, ^3J = 8 Hz, 2H) ; 3,07 (t, ^3J = 6 Hz, 2H) ; 3,46 (t, ^3J = 6 Hz, 2H) ; 3,69 (d, ^2J = 6,79 Hz, 2H) ; 3,91 (t, ^3J = 3 Hz, 1H) ; 4,70 (s, 1H).

RMN ^{13}C (méthanol D_4) δ (ppm) : 15,03 ; 24,53 ; 24,53 ; 27,27 ; 33,38 ; 38,66 ; 41,40 ; 64,17 ; 71,46 ; 77,46 ; 120,47 ; 155,27 ; 174,04 ; 178,26.

Microanalyse pour $C_{18}H_{34}N_2O_7$: attendue C (40,15), H (6,18), N (8) ; déterminée C (39,97), H (7,15), N (8,07).

Composé **8c** $AaEdC_{12}$.



Rendement : 77,5 %.

Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 98.

IR ν (cm^{-1}) : 3412 à 3302 (OH et NH_3^+) ; 2918 et 2852 ($CH_{aliphatique}$) ; 1753 et 1646 (C=O) ; 1556 (C-N) ; 1465 et 1322 (C-C).

RMN ^1H (méthanol D_4) δ (ppm) : 0,89 (t, ^3J = 6,5 Hz, 3H) ; 1,29 (m, 16H) ; 1,60 (m, 2H) ; 2,23 (t, ^3J = 8 Hz, 2H) ; 3,04 (t, ^3J = 6 Hz, 2H) ; 3,43 (t, ^3J = 6 Hz, 2H) ; 3,67 (d, ^2J = 6,79 Hz, 2H) ; 3,89 (t, ^3J = 3 Hz, 1H) ; 4,8 (s, 1H).

RMN ^{13}C (méthanol D_4) δ (ppm) : 14,43 ; 23,5 ; 26,45 ; 30,67 ; 32,99 ; 36,79 ; 38,05 ; 40,58 ; 63,57 ; 70,52 ; 76,85 ; 97,3 ; 177,44 ; 181,96 ; 189,11.

Microanalyse pour $C_{20}H_{38}N_2O_7$: attendue C (41,15), H (5,18), N (8) ; déterminée C (40,97), H (5,15), N (8,07).

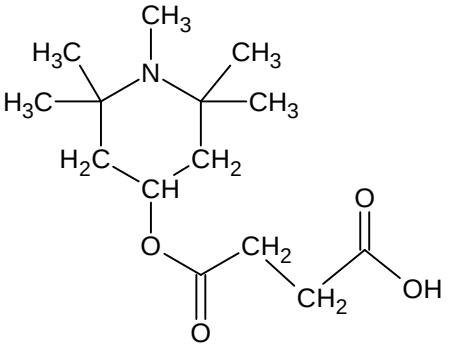
II.1.4. SYNTHESE DES COMPOSES AMPHIPHILES PRESENTANT UN MOTIF AMINE ENCOMBREE

II.1.4.1. Réaction de l'anhydride succinique avec le 1,2,2,6,6-pentaméthyl-pipéridin-4-ol

Un équivalent de 1, 2, 2, 6, 6-penthaméthylpipéridin-4-ol (2,6 g) et un équivalent d'anhydride succinique (1,5 g) solubilisés 100 mL de toluène sont placés dans un ballon de 250 mL. Selon les conditions expérimentales testées, 1 à 10 équivalents de pyridine sont ajoutés et le montage équipé

ou non d'un Dean Stark. Après 24 heures à reflux, le mélange réactionnel est refroidit et le solvant évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu est séché au dessiccateur 24 heures puis analysé. Pour des simplifications d'écriture dans les codes produits utilisés ultérieurement la partie antioxydante correspondant au composé **9** sera notée « Pi ».

Caractéristiques du composé **9** (Pi).



Rendement : 99 %.

Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 65.

IR ν (cm^{-1}) : 3430 (O-H) ; 2972 ($CH_{aliphatique}$) ; 1733 (C=O) ; 1572 (N-C) ; 1396 (C-C).

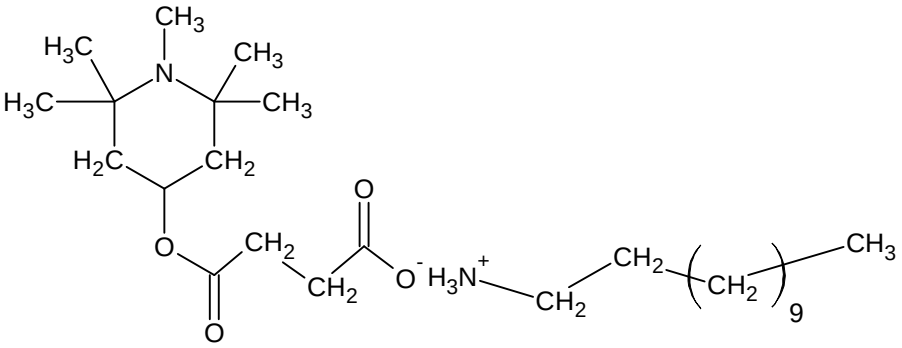
RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1,29 (s, 6H) ; 1,37 (s, 6H) ; 2,01 (d, ^{2}J = 10 Hz, 2H) ; 2,11 (t, ^{3}J = 10 Hz, 2H) ; 2,59 (s, 3H) ; 2,60 (m, 4H) ; 5,00 (m, 1H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 22,13 ; 29,00 ; 32,90 ; 30,41 ; 58,00 ; 43,25 ; 44,91 ; 58,57 ; 60,85 ; 67,68 ; 172,64 ; 177,41.

II.1.4.2. Réactions des amines grasses avec le composé 9

Un équivalent d'acide (1, 2, 2, 6, 6-pentaméthyl-pipéridin-4-yl)-succinique **9** et un équivalent d'amine grasse sont placés dans un ballon de 100 mL dans 15 mL de méthanol. Le mélange est agité vivement pendant 1 heure. Le solvant est ensuite évaporé et le solide obtenu lavé avec 3 volumes de 20 mL d'éther de pétrole pour éliminer l'amine résiduelle. Les composés **10** obtenus sont identifiés avec le code PiC_n où les lettres Pi désignent le motif acide-(1, 2, 2, 6, 6-pentaméthyl-pipéridin-4-yl)-succinique et Cn l'amine grasse dans laquelle n représente le nombre d'atomes de carbone de la chaîne grasse.

Composé **10a** (PiC_8).



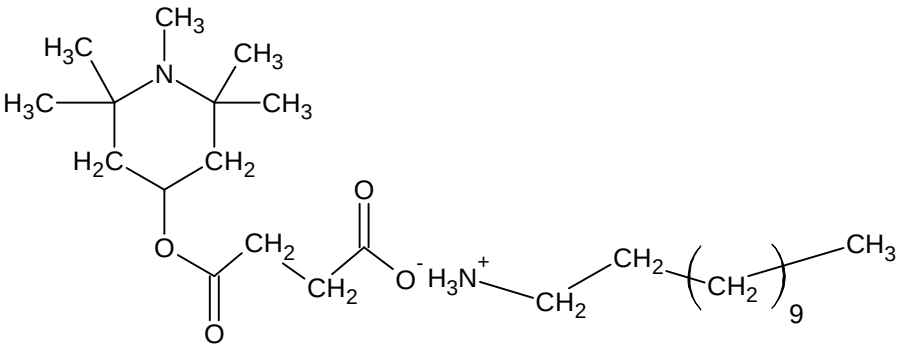
Rendement : 100 %.

Aspect : solide jaune ; PF (°C) : 65.

IR ν (cm^{-1}) : 3434 (NH_3^+) ; 2928 et 2857 ($CH_{aliphatique}$) ; 1731 (C=O) ; 1570 (N-C) ; 1468 (C-C) ; 1394 (COO^-) ; 1168 (C-O).

RMN ^1H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 0,87 (t, ^3J = 6.5 Hz, 3H) ; 1,10 (s, 12H) ; 1,20 (m, 10H) ; 1,60 (m, 2H) ; 1,86 (d, ^2J = 10Hz, 4H) ; 2,32 (s, 3H) ; 2,45 et 2,52 (dd, ^2J = 5Hz, ^2J = 10 Hz, 4H) ; 2,79 (t, ^3J = 10 Hz, 2H) ; 4,95 (m, 1H).

Composé **10b** (PiC_{12}).



Rendement : 99 %.

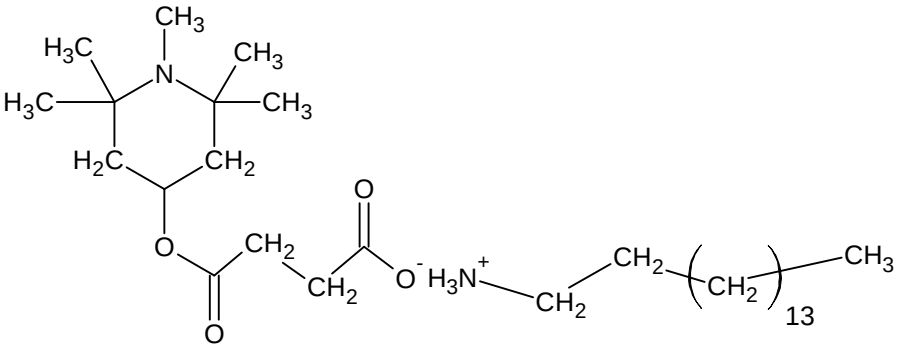
Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 66.

IR ν (cm^{-1}) : 3416 (NH_3^+) ; 2921 et 2851 ($CH_{aliphatique}$) ; 1733 (C=O) ; 1572 (N-C) ; 1528 (C-C) ; 1394 (COO^-) ; 1169 (C-O).

RMN ^1H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 0,81 (t, ^3J = 6.5 Hz, 3H) ; 1,08 (s, 12H) ; 1,17 (m, 18H) ; 1,53 (m, 2H) ; 1,65 (t, ^3J = 10 Hz, 2H) ; 1,81 (d, ^2J = 10 Hz, 2H) ; 2,29 (s, 3H) ; 2,39 et 2.46 (dd, ^2J = 5Hz, ^2J = 10 Hz, 4H) ; 2,75 (t, ^3J = 10Hz, 2H) ; 4,95 (m, 1H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 14,47 ; 21,51 ; 23,09 ; 31,48 ; 32,32 ; 33,10 ; 40,38 ; 45,98 ; 49,11 ; 56,69 ; 63,33 ; 67,48 ; 173,76 ; 178,86.

Composé **10c** (PiC_{16}).



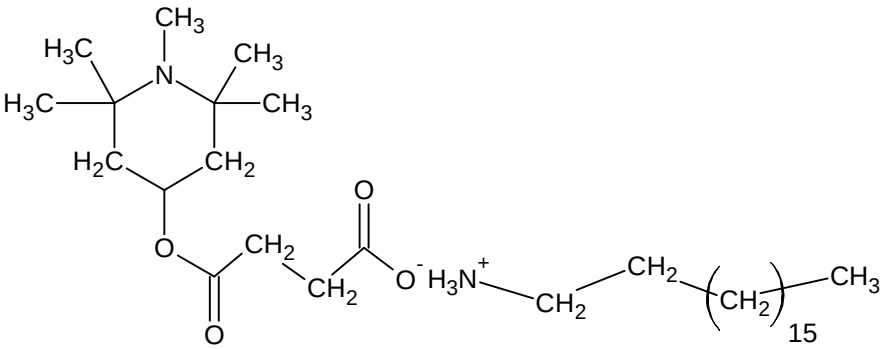
Rendement: 100 %.

Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 67.

IR ν (cm^{-1}) : 3418 (NH_3^+) ; 2919 et 2850 ($CH_{aliphatique}$) ; 1733 (C=O) ; 1569 (N-C) et 1528 (C-C) ; 1383 (COO^-) ; 1166 (C-O).

RMN ^1H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 0,8 (t, ^3J = 6.5 Hz, 3H) ; 1,01 (s, 12H) ; 1,12 (m, 26H) ; 1,50 (m, 2H) ; 1,77 (t, ^3J = 10 Hz, 2H) ; 1,84 (d, ^2J = 10 Hz, 2H) ; 2,36 (s, 3H) ; 2,46 (dd, ^2J = 5 Hz, ^2J = 10 Hz, 4H) ; 2,71 (t, ^3J = 10 Hz, 2H) ; 4,95 (m, 1H).

Composé **10d** (PiC_{18}).



Rendement : 98 %.

Aspect : solide blanc ; PF (°C) : 67-68.

IR ν (cm^{-1}) : 3420 (NH_3^+) ; 2919 et 2850 ($CH_{aliphatique}$) ; 1733 (C=O) ; 1528 (N-C) ; 1394 (COO^-) ;. 1165 (C-O).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 0,81 (t, ^{3}J = 6.5Hz, 3H) ; 1,12 (s, 12H) ; 1,2 (m, 30H) ; 1,49 (m, 2H) ; 1,98 (d, ^{2}J = 10 Hz, 4H) ; 2,38 (s, 3H) ; 2.46 (d, ^{2}J = 10 Hz, 4H) ; 2,72 (t, ^{3}J = 10 Hz, 2H) ; 4,95 (m, 1H).

II.2. PHYSICOCHIMIE

II.2.1. DETERMINATION DES PROPRIETES DE SURFACE D'UN TENSIOACTIF

II.2.1.1. Généralités et principe de la tensiométrie

Lorsqu'un produit amphiphile est synthétisé et isolé pur, il est nécessaire de caractériser ses propriétés surfactives afin de connaître ses domaines d'application avec plus de précision. Dans un premier temps, la solubilité maximale dans l'eau est une donnée importante à évaluer, puis il faut ensuite déterminer la concentration critique où des agrégats se forment, c'est-à-dire la Concentration Agrégative Critique (CAC) ainsi que la Concentration Micellaire Critique (CMC), mentionnée précédemment (Ginn *et al.*, 1960 ; Williams et Smolen, 1972).

Différentes techniques peuvent être utilisées pour déterminer la CAC, comme la conductivité, la tensiométrie ou encore la diffusion de la lumière…. Nous avons utilisé celle de la tensiométrie qui permet d'obtenir des caractéristiques supplémentaires comme la tension superficielle et la surface par tête polaire (Ruso *et al.*, 2000).

Comme leur nom l'indique, les tensioactifs agissent sur les propriétés de surface. En effet, comme cela a déjà été évoqué, la structure des tensioactifs associant une partie polaire et une partie apolaire, entraîne une adsorption préférentielle de ces molécules aux interfaces, et c'est cette adsorption qui est responsable de la plupart des propriétés tensioactives de celles-ci (Koch *et al.*, 1993 ; Le Perchec, 1994).

Lorsqu'une goutte d'eau est posée sur une surface qu'elle ne mouille pas, elle prend une forme sphérique et ne s'étale pas. Un insecte (araignées d'eau, moustiques,…) peut marcher sur l'eau sans s'y enfoncer. Tous ces phénomènes ont un point commun ; tout se passe comme si le liquide, et en particulier la surface de ce liquide, avait les propriétés d'une membrane élastique tendue, minimisant au maximum sa surface et s'opposant à toute déformation qui tendrait à l'augmenter. C'est cette propriété que l'on appelle *tension superficielle*.

Au niveau microscopique, ce phénomène s'explique par l'examen des forces s'exerçant sur les molécules (Figure 42).

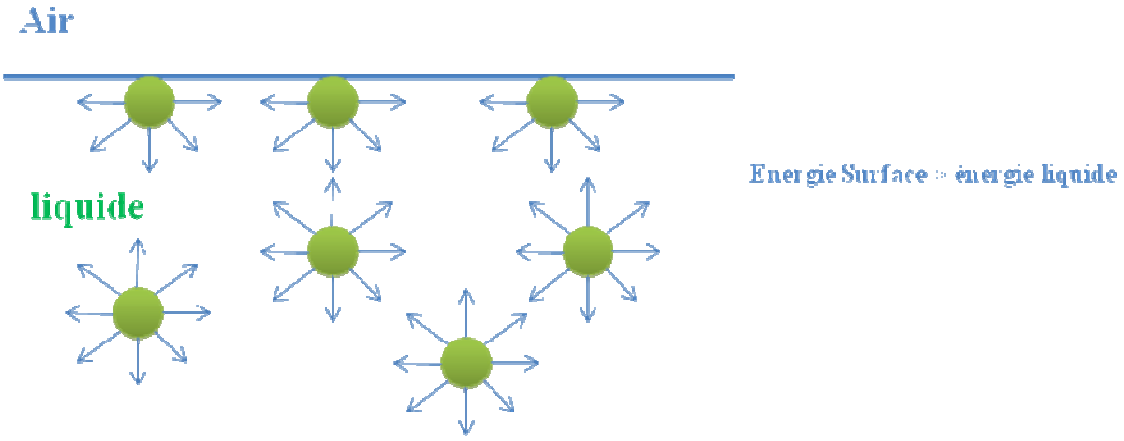


Figure 42. Forces d'attraction sur les molécules

Ainsi, les molécules à la surface d'un liquide sont soumises de la part de leurs voisines de surface et de celles situées en profondeur à des forces d'attraction dont la résultante est dirigée vers l'intérieur du liquide. Par contre la résultante est nulle pour les molécules à l'intérieur du liquide. Les molécules en surface ont donc tendance à rentrer au sein du liquide. Cette évolution du système correspond à une énergie minimale et l'état stable à une surface minimale. La tension superficielle correspond au travail à fournir pour augmenter la surface.

La tension superficielle est donc la force par unité de longueur résultant de l'énergie superficielle libre, énergie qui se manifeste dans le travail à fournir pour augmenter la surface d'un liquide, de façon isotherme et réversible. Elle s'exprime en Newton par mètre ($N.m^{-1}$). Dans la pratique, on utilise le millinewton par mètre ($mN.m^{-1}$) qui correspond au dyne par centimètre ($dyne.cm^{-1}$) (Stuke, 1967).

II.2.1.2. Détermination de la tension de surface et de la concentration agrégative critique

La technique de la tensiométrie, qui fait partie des méthodes le plus économiques et les plus simples à mettre en œuvre, permet de déterminer la CAC par mesure de la tension superficielle γ des solutions aqueuses du composé à caractériser (Rico-Lattes et Lattes, 1994). Nous avons choisi d'utiliser la méthode de la lame de Wilhelmy.

Le tensiomètre comporte une lame de platine dépolie suspendue à une balance électromagnétique. La nature du matériau de la lame doit la rendre parfaitement mouillable par le fluide. La rugosité du platine dépoli convient tout à fait puisqu'elle permet de parfaire le mouillage. Cette lame est plongée dans la solution aqueuse du composé puis remontée jusqu'à ce que le bord inférieur affleure la surface et provoque la formation d'un ménisque. Si on continue à extraire la lame du liquide, on recouvre sa surface d'une gaine de mouillage (Figure 43).

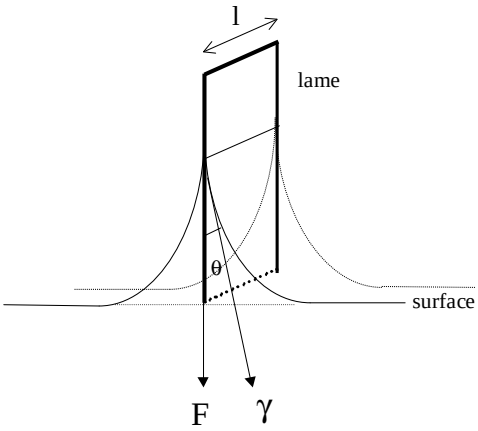


Figure 43. Illustration de la lame de Wilhelmy

La force d'extraction mesurée par la balance est proportionnelle à γ la tension superficielle. C'est en fait la force nécessaire pour compenser le poids du ménisque et elle s'exprime par l'équation :

$$\mathbf{F = 2} \times \mathbf{L} \times \boldsymbol{\gamma} \times \mathbf{cos\theta}$$

L'équation précédente, qui permet la détermination de la tension superficielle, ne peut être utilisée en réalité que si θ est nul, car on ne peut pas le mesurer. Le mouillage de la lame doit donc être total. On a alors :

$$\boldsymbol{\gamma} = \mathbf{F/ (2} \times \mathbf{l)}$$

Gibbs a étudié les variations de tension superficielle causées par des faibles ajouts de tensioactifs (Edwards, 1961 ; Gibbs, 1902,1903). Il a établi une relation à partir de l'expression de l'énergie libre de surface qui, après simplification, conduit à l'Équation 1.

$$\mathbf{A.d\gamma + \sum_i n_i.d\mu_i = 0} \qquad \textbf{Équation 1}$$

avec **A** : aire de la surface

$\mathbf{n_i}$: nombre de moles de l'espèce i à la surface

$\boldsymbol{\mu_i}$: potentiel chimique de l'espèce i

$\boldsymbol{\gamma}$: tension superficielle

L'équation de Gibbs (Équation 2) permet de relier la quantité de tensioactif adsorbé à la surface et l'effet produit sur la tension superficielle.

$$\mathbf{\frac{d\,\gamma}{d\log C} = -2{,}303.R.T.\Gamma_2} \qquad \textbf{Équation 2}$$

avec **C** : concentration totale en tensioactif

R : constante des gaz parfaits = 8,314 $J.K^{-1}.mol^{-1}$

T : température en Kelvin

$\mathbf{\Gamma_2 = n_2/A}$ concentration d'excès de surface du tensioactif (le $_2$ désigne le soluté tensioactif en absence d'électrolyte fort : $\mathbf{d\gamma = -2{,}303.R.T.\Gamma.2.dln(f\pm C)}$)

Cette relation démontre que l'augmentation de la concentration en tensioactifs provoque une saturation progressive de la surface. Ceci se traduit par un abaissement linéaire de la tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration.

Ces mesures sont essentielles pour la détermination de l'excès de surface de Gibbs (Γ) qui mesure la quantité de corps dissous adsorbée aux interfaces de liquide-vapeur (Vogler, 1995a, 1995b,1998). L'inverse de la concentration d'excès de surface Γ est égal à la surface occupée par une mole de tensioactif. On en déduit ainsi la surface par tête polaire (σ) en divisant par le nombre d'Avogadro $\mathcal{N}$.

$$\sigma = \frac{-2{,}303.R.T.\ 2}{\frac{d\gamma}{d\log C}\ \mathcal{N}}$$

Figure 44. Calcul de la surface par tête polaire des composés tensioactifs

Les variations de la tension superficielle d'une solution aqueuse d'un tensioactif, représentées par la Figure 45, obéissent à l'équation de Gibbs jusqu'à une certaine concentration. Au-delà de celle-ci se produit un phénomène d'agrégation des molécules surfactives et il y a rupture de pente.

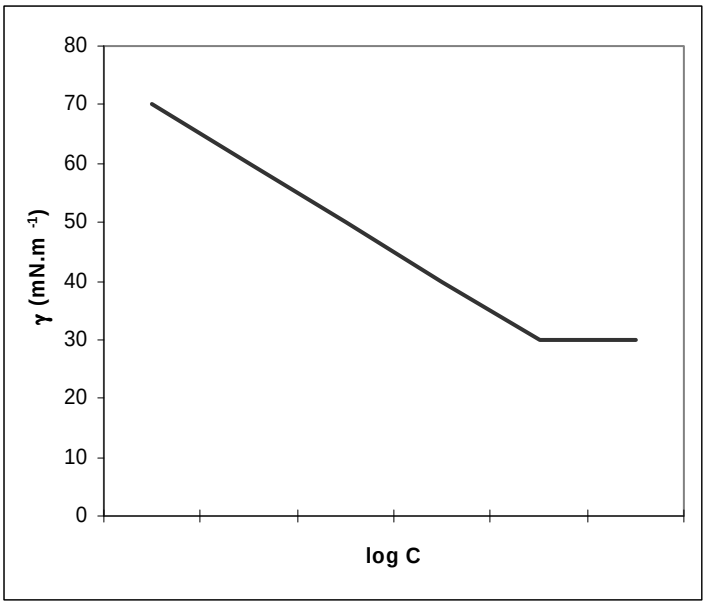


Figure 45. Courbe de tension superficielle de solutions aqueuses de surfactifs

En effet, les premières molécules introduites dans l'eau forment une vraie solution, les monomères sont entourés par le liquide. Très rapidement lorsque la concentration augmente, les molécules vont fuir vers la surface, les têtes polaires dans l'eau et les queues hydrophobes au contact de l'air. Les molécules cherchent à trouver le maximum de surface libre. La tension superficielle diminue alors. Le travail nécessaire pour augmenter la surface diminue avec l'augmentation de la concentration en tensioactif (Krafft, 1895).

Lorsque la surface est saturée et toujours pour minimiser l'énergie du système, les queues apolaires s'agrègent entre elles pour former différents agrégats suivant le type de molécules. Ce

phénomène est caractérisé par le terme « *effet hydrophobe* ». La tension superficielle est alors stabilisée. Au-delà de la CAC aucun effet de surface n'est observé. Expérimentalement la CAC ou la CMC sont déterminées par le point d'inflexion.

Ce phénomène d'agrégation peut donc être considéré comme un mécanisme permettant d'abaisser l'énergie interfaciale du surfactant lorsque toutes les interfaces sont saturées en molécules adsorbées.

La valeur ($d\gamma/d\log C$) dans les équations (1) et (2) représente la pente de la courbe $\gamma = f(\log C)$ avant la CMC.

II.2.1.3. Mesure de la tension superficielle et conditions expérimentales

La tension superficielle est mesurée à partir d'une solution concentrée à partir de laquelle, différentes dilutions sont réalisées. L'ordre de mesures respecte l'évolution croissante en concentration des solutions. Allant ainsi, de la plus petite vers la plus concentrée, avec une prise de la mesure de l'eau déminéralisée entre deux valeurs.

Les mesures de tension superficielle ont été réalisées avec un tensiomètre DIGITAL-TENSIOMETER K10T. Le système est thermostaté par un circuit d'eau à 25°C et le tensiomètre connecté à un ordinateur via une interface numérique qui permet de mesurer la tension superficielle en fonction du temps. La valeur est prise en compte une fois la stabilité de la mesure obtenue.

Les résultats sont corrects et reproductibles uniquement si la lame et la verrerie sont rigoureusement nettoyées avec une solution d'acide sulfochromique. Cette méthode nécessite un grand nombre de mesures qui peuvent durer jusqu'à une heure, l'obtention d'une courbe complète prend plusieurs jours.

II.2.1.4. Mesure de la solubilité des produits de synthèse

Les solubilités sont obtenues à partir de solutions saturées. Celle-ci sont centrifugées et un volume précis de surnageant est récupéré puis lyophilisé. Le lyophilisat obtenu donne la quantité de produit présent dans le volume prélevé. Les essais sont réalisés avec une moyenne de quatre échantillons par produit. Le lyophilisateur utilisé est de marque CHRIST L-1 Alpha 2-4.

II.2.2. CARACTERISATION DES PROPRIETES ANTIOXYDANTES

L'activité antioxydante d'une substance peut se mesurer par sa capacité à inhiber l'oxydation d'un système choisi comme référence. Nous utiliserons au cours de ce travail deux systèmes de mesure différents. L'un est basé sur l'oxydation de l'acide linoléique, l'autre sur la vitesse de transfert d'un atome d'hydrogène mobile de la substance à étudier à un radical libre, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH.

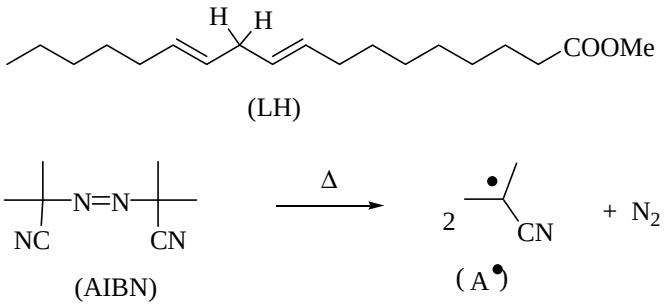
II.2.2.1. Méthode expérimentale utilisant l'oxydation du linoléate de méthyle

a) Principe

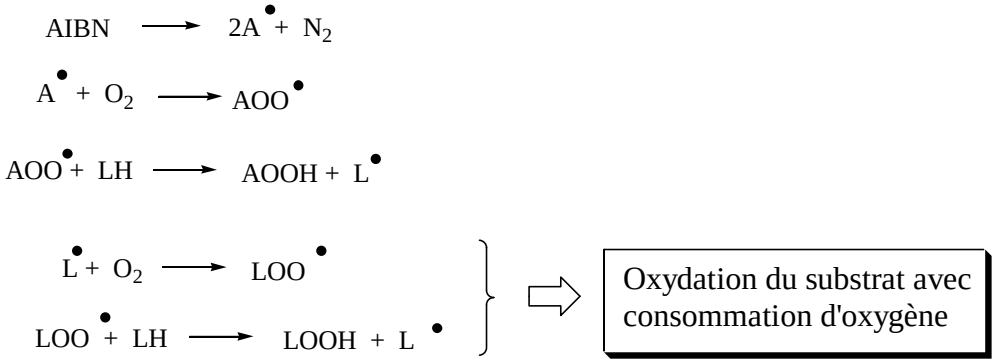
Les acides gras polyinsaturés s'oxydent lentement à l'air et à température ambiante. La réaction peut cependant être accélérée en augmentant la température et en utilisant un amorceur radicalaire. Ce dernier facilite la chaîne d'oxydation.

Le dispositif expérimental est constitué de deux parties : la station de vide et de stockage de l'oxygène d'une part et la partie réaction d'autre part. Les réactions d'oxydation ont lieu dans un réacteur en pyrex à double enveloppe thermostaté. Un tube capillaire plonge dans le réacteur pour assurer, par l'intermédiaire d'une pompe, l'agitation et la saturation en oxygène de la phase liquide. Le réacteur est surmonté d'un réfrigérant à 4°C pour condenser le solvant. Le volume de la phase liquide est de 4 cm^3, celui de la phase gazeuse d'environ 100 cm^3. La consommation d'oxygène est suivie expérimentalement par la mesure de la pression surmontant le mélange réactionnel. Notons que l'azote libéré par l'AIBN étant formé en très faible quantité, la pression mesurée est pratiquement égale à celle de l'oxygène.

Le protocole expérimental utilisé au laboratoire concerne l'oxydation du linoléate de méthyle (LH), amorcée par l'azobisisobutyronitrile (AIBN), le solvant étant le butan-1-ol et la température de la réaction étant fixée à 60°C. L'effet de substances antioxydantes sur la réaction d'oxydation peut être schématisé de la manière suivante (Figure 46) :



En absence d'antioxydant :



En présence d'antioxydant (ϕH) :

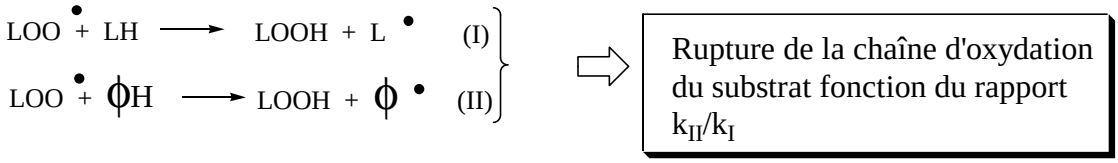


Figure 46. Effet de substances antioxydantes sur l'oxydation du linoléate de méthyle

Dans les deux cas (avec ou sans antioxydant) les réactions d'oxydation sont amorcées par la décomposition de l'azobisisobutyronitrile, qui va entraîner la formation d'hydroperoxydes et par l'oxydation du linoléate de méthyle, qui va assurer la propagation du processus d'oxydation avec consommation d'oxygène. En présence d'antioxydant (ϕH), la réaction d'oxydation (I) se trouve en compétition avec la réaction (II), qui, si le radical $\phi^{\cdot}$ formé est stable, va inhiber la réaction d'oxydation.

b) Conditions expérimentales de la mesure du pouvoir antioxydant en utilisant la méthode au linoléate de méthyle

Dans un réacteur thermostaté sont introduits successivement 1 mL de butan-1-ol, dans lequel sont solubilisés 4 équivalents de composé antioxydant (ϕH) à tester, 1 mL d'une solution de linoléate de méthyle (LH) 0,4 M dans du butan-1-ol ou 2 mL d'estorob (mélange d'esters d'acides gras insaturés contenant majoritairement du linoléate de méthyle à environ 75 %) et 2 mL d'une solution d'AIBN (azobisisobutyronitrile) 9,3 mM dans du butan-1-ol. La réaction est laissée sous agitation durant 3 heures à une température de 60°C sous une pression initiale de 150 Torrs. L'évolution de la pression dans le réacteur au cours du temps est directement proportionnelle à la quantité d'oxygène consommée au cours de la réaction. Les données sont enregistrées automatiquement par un système informatisé doté d'un logiciel OXY BAR.

II.2.2.2. Méthode utilisant le DPPH

a) Principe

Une autre méthode de la mesure de l'activité antioxydante est l'étude de la réactivité des composés en question avec un radical libre choisi. Un de ces radicaux est le DPPH (2,2-diphényl-1-pycrylhydrazyle), commode à utiliser en raison de sa couleur violette (absorbance maximale vers 520 nm) et de sa disponibilité dans le commerce. La réaction de certains antioxydants avec le DPPH est assez rapide et nécessite l'utilisation de la technique de l'écoulement bloqué (Stopped flow) dans laquelle le mélange des réactifs est effectué en quelques millisecondes à l'entrée d'une cellule d'analyse, ce qui permet l'étude des réactions de temps de demi-réaction aussi petits que 10 ms.

La réaction de phénols ou d'autres molécules donneuses d'un atome d'hydrogène avec le DPPH est couramment utilisée pour évaluer le pouvoir antioxydant (ou antiradicalaire) de ces molécules en solution homogène. On conçoit, effectivement, que la mesure de la constante de vitesse de la réaction puisse constituer une estimation de la mobilité de l'atome d'hydrogène de ΦOH (Figure 47).

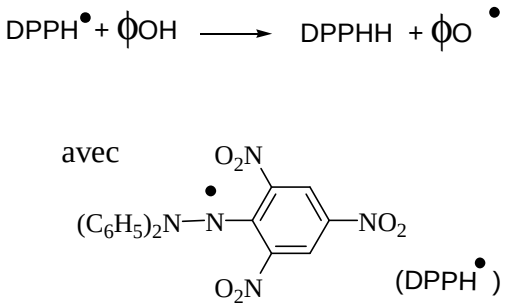


Figure 47. Réaction entre les phénols et le radical DPPH

La cinétique des réactions du DPPH avec différents phénols ou extraits de bois a été rapportée par Diouf (1999,2002) en utilisant la technique de l'écoulement bloqué, qui mélange rapidement dans des temps inférieurs à 20 ms les réactifs dans une cellule permettant l'analyse par absorption UV-visible ou par fluorescence.

L'évolution de la concentration du radical DPPH au cours du temps permet de quantifier le pouvoir antioxydant des différents produits. Ce dernier est évalué en mesurant le temps de demi vie ($t_{1/2}$), temps au bout duquel la moitié du radical DPPH initialement présent a disparu (Figure 48).

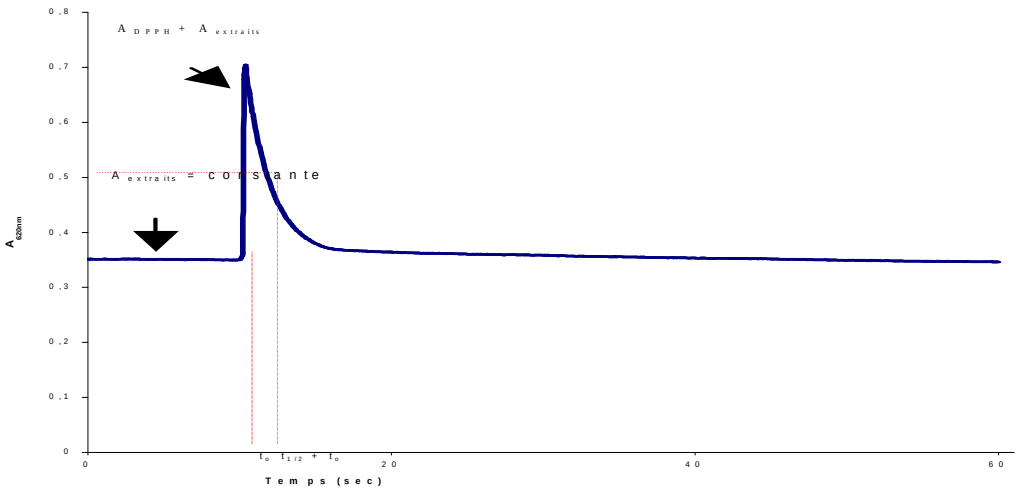


Figure 48. Détermination du temps de demi-réaction de la réaction du radical du DPPH avec différents composants antioxydants

b) Conditions expérimentales de la mesure du pouvoir antioxydant en utilisant la méthode au DPPH

Une solution de DPPH à 2.10^{-4}M et une autre contenant une dilution du composé à tester sont placées dans les seringues du système de mesure. Ces solutions sont poussées par deux pistons actionnés simultanément à la main vers l'entrée de la cellule d'observation photométrique où elles sont rapidement mélangées. Le mélange est poussé par la suite vers la seringue d'arrêt. Pendant le remplissage de la seringue d'arrêt, l'expérience est constamment répétée avec différentes dilutions. Le mélange réactionnel reste constamment renouvelé dans la cellule d'observation et le temps zéro de réaction correspond à l'arrêt brusque du fluide « Stopped flow ». Le schéma de l'appareillage est représenté par la Figure 49.

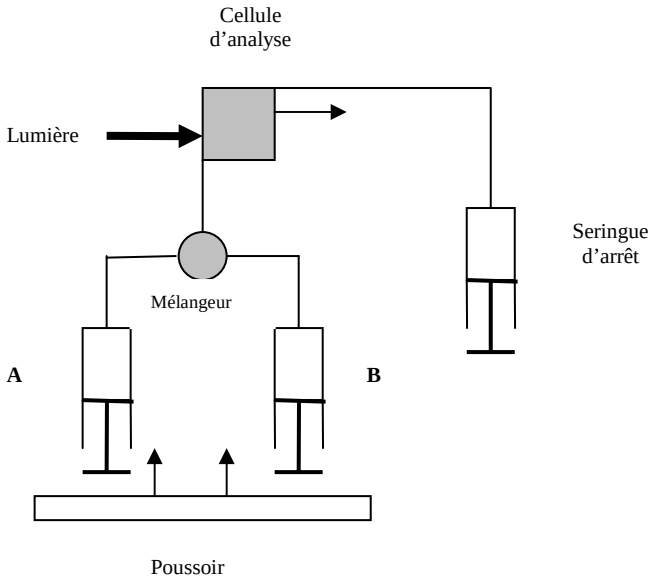


Figure 49. Principe du spectrophotomètre à écoulement bloqué

La mesure de l'activité antioxydante des molécules étudiées se fait par détermination de la concentration nécessaire pour atteindre un équilibre avec une consommation de 50 % en DPPH. Plus la concentration nécessaire en composé phénolique pour atteindre cet équilibre est faible et plus celui-ci est efficace.

II.3. ESSAIS BIOLOGIQUES

II.3.1. MATERIEL

Nous avons mené l'ensemble des expérimentations avec une angiosperme, le hêtre *Fagus sylvatica,* connu pour sa faible résistance aux champignons. Les échantillons de bois ont été préparés sous forme d'éprouvettes de dimensions 2,5 x 1,5 x 0,5 cm. Nous avons retenu une pourriture blanche *Coriolus versicolor* du fait de la dégradation considérable qu'elle provoque en s'attaquant à la lignine et aux polysaccharides du bois.

Avant imprégnation les éprouvettes de bois à traiter sont séchées 48 heures à l'étuve à une température de 103°C puis maintenues à l'état anhydre jusqu'à l'imprégnation. La masse anhydre avant traitement (m_0) est déterminée en (g).

II.3.2. IMPREGNATION DES EPROUVETTES

Les éprouvettes sont placées dans une cloche à vide, munie d'un robinet à double voie. Six éprouvettes sont placées dans un bêcher et recouvertes de billes de verre les empêchant de flotter lors de l'injection de la solution. Les différents produits non miscibles à l'eau (propiconazole, Irganox 1076, Tinuvin 770) sont solubilisés dans l'éthanol aux concentrations indiquées dans la partie résultats et discussion. Les formulations effectuées avec les différents tensioactifs antioxydants sont réalisées dans l'eau. Une pression de 5 mbar est maintenue à l'intérieur de la cloche pendant 15 minutes. La connexion avec la pompe est ensuite fermée et la solution de traitement est alors introduite par aspiration jusqu'à ce que les éprouvettes soient totalement recouvertes. Après retour à la pression atmosphérique, l'ensemble est laissé à repos pendant deux heures, les éprouvettes sont ensuite égouttées puis séchées à l'étuve jusqu'à ce que leur masse (m_1) reste constante (environ 48 heures).

II.3.3. ESSAI BIOLOGIQUES SUR EPROUVETTES DE BOIS

II.3.3.1. Préparation du milieu

Un litre de milieu gélosé est préparé en additionnant 40 g de malt et 30 g d'agar dans un litre d'eau distillée. Le mélange est chauffé à environ 100°C jusqu'à homogénéisation, le pH est ajusté à 4,8 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 N. Puis la solution gélosée est stérilisée à l'autoclave à 120°C pendant 25 minutes.

Après refroidissement, sous la hotte préalablement nettoyée à l'éthanol et stérilisée aux UV, le milieu gélosé stérilisé est coulé en petite quantité (environ 20 mL) dans des boites de Pétri de 8,5 cm de diamètre à proximité d'une flamme. Après refroidissement et solidification du milieu, ce dernier est inoculé en son centre avec un disque gélosé de mycélium fongique d'une culture âgée de 2 semaines. Les boîtes sont laissées à incuber dans une enceinte climatique Binder KBF à 22°C et à 70 % d'humidité relative jusqu'à ce que le mycélium recouvre totalement le milieu de culture (1 à 2 semaines).

II.3.3.2. Confrontation des éprouvettes au champignon

Les éprouvettes traitées ou non sortant de l'étuve et rapidement pesées (m_1 ou m_0 pour les éprouvettes traitées ou non respectivement) sont placées dans des conditions stériles sur le milieu gélosé recouvert de mycélium à raison de trois éprouvettes par boite. Elles sont ensuite laissées au contact du champignon à 22°C et 70 % d'humidité relative pendant un temps variable pouvant atteindre seize semaines. A l'issue de la période d'incubation, les éprouvettes sont retirées des boîtes de Pétri et débarrassées du mycélium adhérent. Elles sont ensuite séchées jusqu'à obtention de leur masse anhydre (m_2). L'efficacité du traitement est estimée par la perte de masse en utilisant la formule suivante :

$$\text{Perte de masse} = ((m_2 - m_{1ou\,0}) / m_{1ou\,0}) \times 100$$

où m_2 est la masse sèche de l'éprouvette après la période d'incubation.

II.3.4. ESSAI D'INHIBITION DE CROISSANCE SUR MILIEU GELOSE

Le milieu de culture est préparé à partir de 20 g de malt et 40 g d'agar dissous dans un litre d'eau distillée. Le mélange est alors chauffé à environ 70°C jusqu'à obtention d'une solution homogène, puis le pH ajusté à 4,8 à l'acide d'une solution d'acide chlorhydrique 1 M puis stérilisé. Après refroidissement, La solution gélosée encore tiède est réparti dans des fioles erlenmeyers de 100 mL préalablement stérilisées, dans lesquelles sont rajoutés les produits à tester solubilisés dans le minimum d'eau ajoutés dans des conditions stériles (filtration à l'aide d'un filtre membranaire

millipores de 0,45 µm). Les milieux de culture contenant les produits aux différentes concentrations sont alors coulés en petite quantité (20 mL) dans des boites de pétri à proximité d'une flamme.

Après gélification du milieu, les boîtes sont inoculées avec le champignon d'essai et l'activité inhibitrice des produits évaluée quotidiennement en mesurant l'évolution de la croissance du rayon de la colonie et comparaison avec des boîtes témoins. Le pourcentage de croissance du champignon à un moment t est calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ de croissance} = (d / 8{,}5) \times 100$$

où d correspond à la moyenne de deux mesures de diamètres de l'auréole de croissance du champignon au moment t.

II.3.5. ESSAI SUR PAPIER FILTRE

Afin de vérifier si certains produits synthétisés possèdent des propriétés fongicides, des tests d'inhibition de croissance de *Coriolus versicolor* ont été effectués. Pour cela, des disques de papier ont été imprégnés des produits préparés à différentes concentrations, puis déposés sur un milieu gélosé au centre duquel le champignon est inoculé. Chaque milieu contient deux disques traités et un non traité. La cellulose utilisée est de type filtre Whatman. Les disques de cellulose mesurant 7 mm de diamètre ont été sectionnés à l'aide d'un emporte pièce. L'ensemble est stérilisé à l'autoclave, les celluloses sont ainsi placées dans un bocal enrobé de film d'aluminium.

Les disques sont disposés triangulairement trois par trois dans des boites de Pétri de 8,5 cm de diamètre contenant un milieu malt agar et le champignon inoculé au centre de la boite. Chaque boite contient un disque de papier non imprégné, échantillon servant comme témoin de virulence et deux disques imbibés de 15 µL de produit à tester prélevés à la micro pipette puis déposés sur les disques de cellulose. L'effet de chaque produit est estimé visuellement par des observations quotidiennes de l'auréole de croissance du champignon dans les boites.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. ESSAIS PRELIMINAIRES METTANT EN EVIDENCE LES EFFETS DE SYNERGIE ENTRE BIOCIDE ET ANTIOXYDANT

Nous avons dans un premier temps évalué l'effet de deux antioxydants utilisés couramment pour différentes applications. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser l'Irganox 1076 appartenant à la famille des phénols encombrés et le Tinuvin 770 appartenant à la famille des amines encombrées (Figure 50). Ces deux produits nous ont été fournis par la Société Novartis.

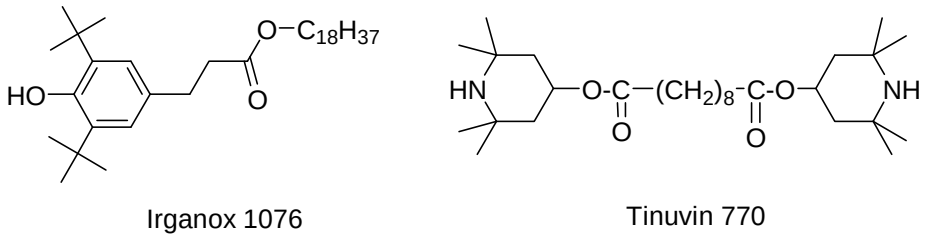


Figure 50. Structure des antioxydants testés

Préalablement à toute mesure de synergie impliquant l'utilisation de mélange de biocide et d'antioxydant, nous avons déterminé si ces composés possédaient une activité biologique et mesuré avec précision le seuil d'activité de chaque composé pris séparément. Les concentrations de biocide et d'antioxydant, utilisées dans les mélanges destinés à évaluer les effets de synergie, ont alors été choisies de telle manière qu'elles ne permettent pas à elles seules de protéger les échantillons de bois. En effet, la recherche de synergie ne peut être possible que si les produits utilisés n'inhibent pas totalement l'action du champignon permettant ainsi de détecter d'éventuels effets lors des mélanges de produits.

III.1.1. DETERMINATION DES SEUILS D'ACTIVITE DE CHAQUE COMPOSE

La détermination de l'effet de chaque composé et des seuils d'efficacité ont été réalisés sur éprouvettes de bois. Pour cela, les éprouvettes de bois ont été imprégnées par une solution aqueuse de chaque composé à tester, à différentes concentrations et exposées à un agent de pourriture sur milieu gélosé. Les essais ont été réalisés avec des éprouvettes de hêtre et avec *Coriolus versicolor* comme champignon d'essai.

III.1.1.1. Cas du Tinuvin770

Nous avons tout d'abord testé l'effet du Tinuvin 770 sur la protection d'éprouvettes de hêtre exposées à *Coriolus versicolor*. Les résultats sont rapportés dans la Figure 51.

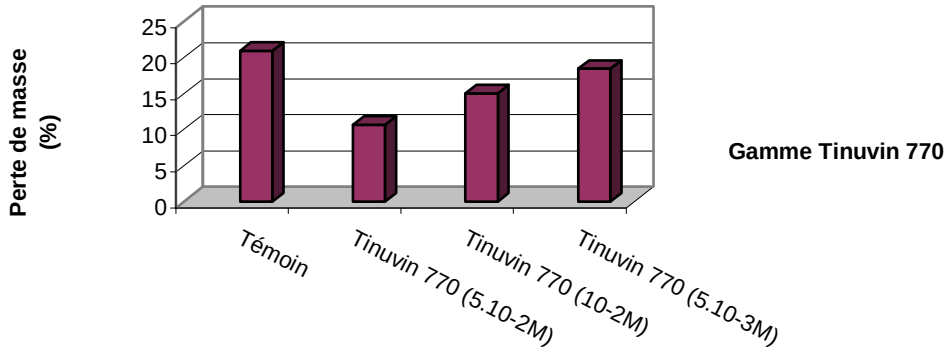


Figure 51. Pertes de masse moyennes des éprouvettes traitées par le Tinuvin 770

On constate des pertes de masse importantes après 6 semaines pour les éprouvettes témoins. A la concentration de 5.10^{-3} M, les éprouvettes traitées sont pratiquement autant dégradées que les éprouvettes témoins. Par contre l'imprégnation du bois par une solution de Tinuvin 770 à une concentration supérieure à 10^{-2}M protège légèrement les éprouvettes de la dégradation par le champignon. Cette protection est d'autant plus importante que la concentration utilisée est grande.

III.1.1.2. Cas de l'Irganox 1076

De la même façon, l'effet de différentes concentrations d'Irganox 1076 ont été évaluées sur la protection d'éprouvettes de bois. Les résultats sont rapportés dans la Figure 52.

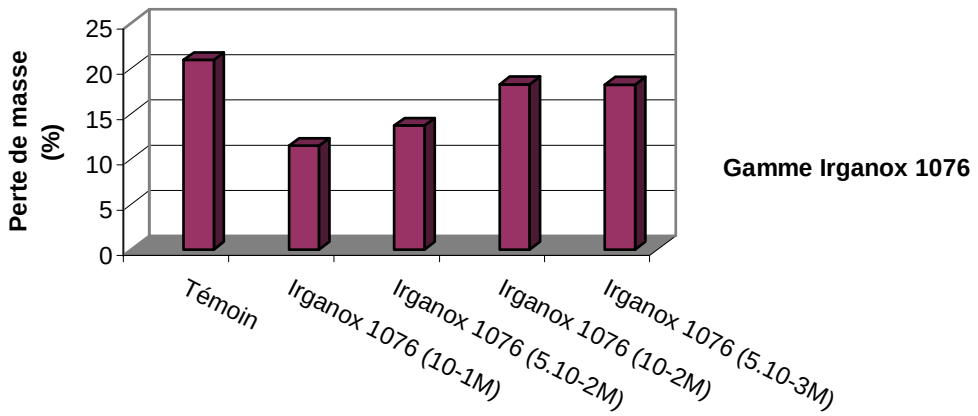


Figure 52. Pertes de masse moyennes des éprouvettes traitées par l'Irganox 1076

Tout comme dans le cas de Tinuvin 770, l'Irganox 1076 confère une légère résistance aux éprouvettes. Les concentrations nécessaires sont légèrement supérieures à celles nécessaires avec le Tinuvin 770 pour obtenir des effets comparables. Aux concentrations testées, l'Irganox 1076 n'est pas capable d'empêcher la dégradation du bois, mais semble toutefois capable de la ralentir.

III.1.1.3. Cas du Propiconazole

L'effet du biocide a été évalué de façon similaire et les résultats sont rapportés dans la Figure 53.

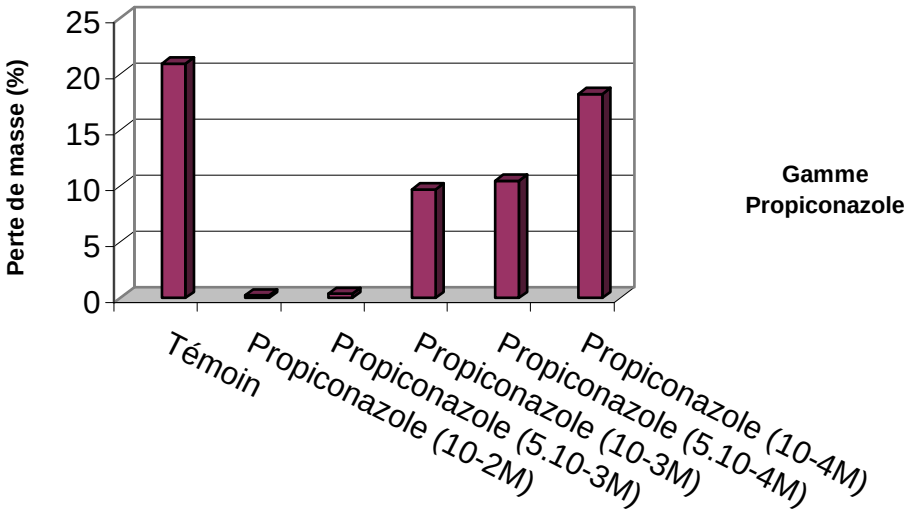


Figure 53. Pertes de masse moyennes des éprouvettes traitées par le Propiconazole

Le Propiconazole utilisé à des concentrations supérieures ou égales à 5.10^{-3} M protège efficacement les éprouvettes de hêtre. Un léger effet est encore observé à 10^{-3} M et 5.10^{-4} M alors qu'il devient négligeable à 10^{-4} M.

De manière à pouvoir mettre en évidence d'éventuelles synergies avec les antioxydants testés, nous avons donc choisi de travailler par la suite avec une concentration en propiconazole de 5.10^{-4} M incapable d'inhiber totalement la dégradation du bois à elle seule mais présentant un début d'activité.

III.1.2. EFFETS DE SYNERGIE

Les éprouvettes ont été imprégnées par des solutions mixtes de propiconazole et les différents antioxydants, dans l'éthanol. Les différentes associations testées sont :

- Propiconazole (5.10^{-4} M) + Tinuvin 770 (5.10^{-2} M) ;
- Propiconazole (5.10^{-4}M) + Tinuvin 770 (5.10^{-3} M) ;
- Propiconazole (5.10^{-4} M) + Irganox 1076 (5.10^{-2} M) ;
- Propiconazole (5.10^{-4} M) + Irganox 1076 (5.10^{-3} M).

Les résultats sont rapportés dans la Figure 54.

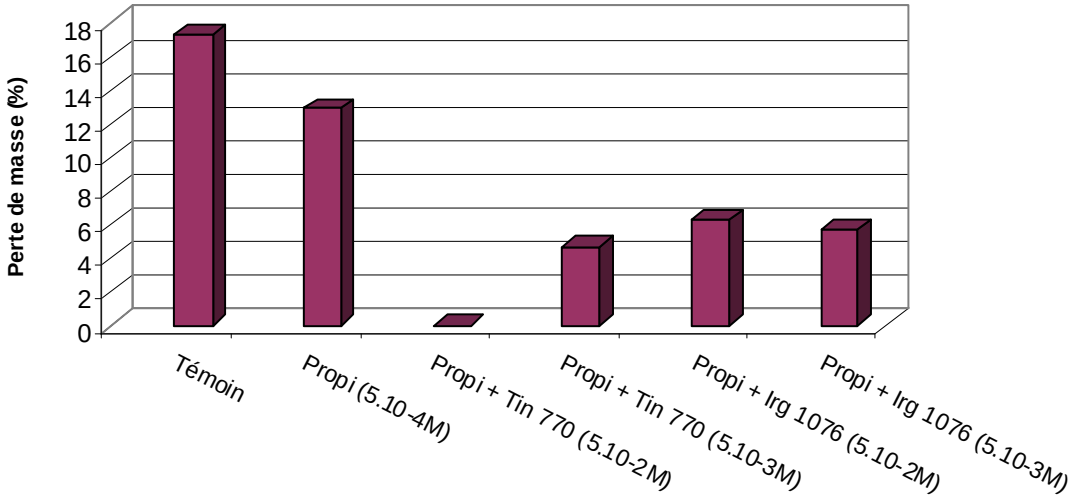


Figure 54. Pertes de masse des éprouvettes traitées par des mélanges de propiconazole et d'antioxydants

L'addition d'Irganox 1076 au propiconazole conduit à une protection supplémentaire partielle des éprouvettes par rapport au propiconazole seul. L'association de Tinuvin 770 (à 5.10^{-2} M) au propiconazole permet une protection totale du matériau alors que chacun des composants du mélange utilisés séparément à ces mêmes concentrations (Figures 51 et 53) ne permet pas d'empêcher la dégradation du bois par le champignon. Ces différentes expériences indiquent sans ambiguïté un effet de synergie entre le Propiconazole et l'antioxydant. Ces résultats corroborent avec ceux rapportés par Schultz dans la littérature concernant l'association de différents biocides et de BHT (Schultz *et al*., 1995,2002) ainsi que différents résultats préliminaires obtenus au laboratoire (Mabicka *et al*., 2004,2005 ; Dumarçay *et al.,* 2005 ; Bakhsous *et al.,* 2006).

Au vu de ces résultats de synergie obtenus avec un mélange d'antioxydant et de propiconazole et compte tenu des nouvelles directives biocides, nous nous sommes donc intéressés à la conception et à la synthèse de tensioactifs fonctionnels présentant des propriétés antioxydantes. L'objectif est en effet de préparer des formulations de fongicides en phase aqueuse au même titre que les formulations actuelles, mais à partir de composés amphiphiles originaux présentant une fonctionnalité supplémentaire, en l'occurrence des propriétés antioxydantes, pouvant permettre d'obtenir des performances accrues tout en diminuant la quantité de biocide nécessaire.

Trois familles de tensioactifs ont été envisagées et synthétisées. Ils ont ensuite été caractérisés du point de vue de leur comportement en phase aqueuse et de leur capacité à former des agrégats. Leur activité antioxydante a ensuite été évaluée par deux méthodes (oxydation du linoléate de méthyle et méthode au DPPH) et enfin leur activité biologique évaluée en préparant et en testant différentes formulations aqueuses à base de propiconazole similaires aux formulations industrielles utilisées actuellement.

III.2. SYNTHESE ET EVALUATION DE NOUVEAUX TENSIOACTIFS NON IONIQUES INCLUANT UN MOTIF PHENOL ENCOMBRE

III.2.1. INTRODUCTION

Compte-tenu des résultats de synergie obtenus, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la conception et à la synthèse de tensioactifs non ioniques comportant un motif antioxydant de type phénol encombré, comportant un motif 2-6-ditert-butyl-4-méthyl-phénol désigné couramment par l'abréviation BHT (tertButyl-Hydroxy-Toluène). Ce type de motif antioxydant, au même titre que le BHA (tertButyl-Hydroxy-Anisole), est abondamment utilisé dans de nombreuses applications industrielles (Udaya *et al.,* 2003), en particulier dans le domaine de l'agro-alimentaire

(Matthess *et al.*, 1998) mais également en tant qu'agent thérapeutique (Duthie *et al.*, 1997a, b ; Pietha *et al.*, 2000 ; Rice Evans *et al.*, 2001).

Nous avons choisi d'exploiter des dérivés que nous avions à notre disposition en grande quantité et de les modifier afin de les rendre amphiphiles. Ces dérivés correspondent aux esters gras de l'acide-3-(3,5-di-*ter*-butyl-4-hydroxyphényl)-propionique. Le module à modifier correspond à la partie « ester gras » puisqu'il faut bien évidemment conserver la partie phénolique, responsable des propriétés antioxydantes. Cette dernière étant hydrophobe, il est nécessaire d'introduire un module hydrophile. Notre choix s'est porté sur l'incorporation d'un module de type polyoxyéthylènique après de la fonction ester (Figure 55).

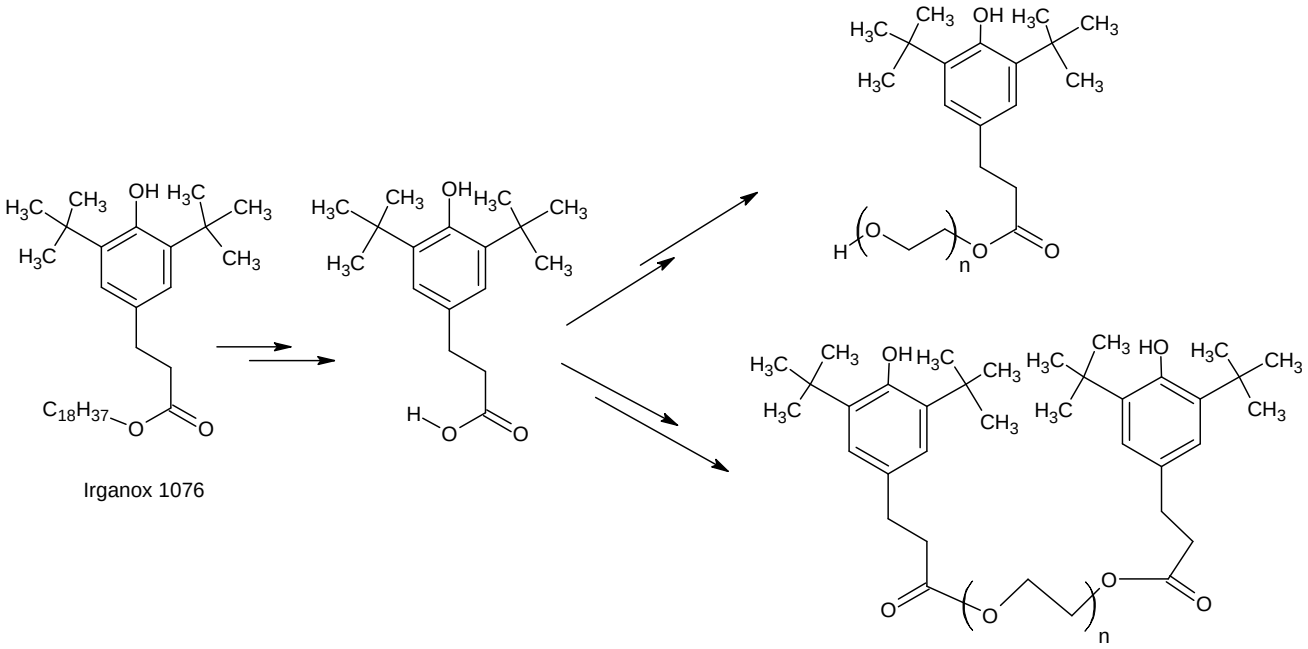


Figure 55. Approche retrosynthétique conduisant aux tensioactifs non ioniques incluant un motif phénol encombré

Les composés tensioactifs non ioniques constituent l'une des grandes familles de molécules amphiphiles (Le Perchec, 1994). L'importance industrielle de ce type de surfactifs n'a cessé de croître dans des domaines aussi différents que l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique, les cosmétiques et même la détergence. Ceci est lié le plus souvent au fait qu'ils s'avèrent moins toxiques que d'autres tensioactifs dont certains tensioactifs ioniques. Dès 1930, Sholler propose une la condensation de polyéthylèneglycols sur des acides gras (Schick, 1966).

Les tensioactifs non ioniques correspondent effectivement en grande partie à des dérivés polyoxyéthylèniques, préparés par addition de composés hydrophobes à hydrogène mobiles sur l'oxyde d'éthylène. Ce type de réaction conduit à un mélange polydispersé de surfactifs homologues,

de masse moléculaire variable dont la distribution statistique suit la loi de Poisson. On ne peut caractériser ce mélange que par une masse molaire moyenne et par le nombre moyen de motifs oxyéthylèniques, mais ceci n'est pas gênant pour la majorité des applications industrielles.

III.2.2. SYNTHESE

L'Irganox 1076 ou le 3-(3,5-di-*ter*-butyl-4-hydroxyphényl)-propionate d'octadécyle a été, dans un premier temps, saponifié par 4 équivalents de soude dans un mélange eau/méthanol (1/9) (v/v) durant 19 heures à 180°C. L'acide est isolé après ré-acidification de la phase aqueuse puis extraction successive par du dichlorométhane et de l'acétate d'éthyle. Le composé est obtenu avec de rendement proche de 95 % et se présente sous forme d'un solide jaune (Figure 56).

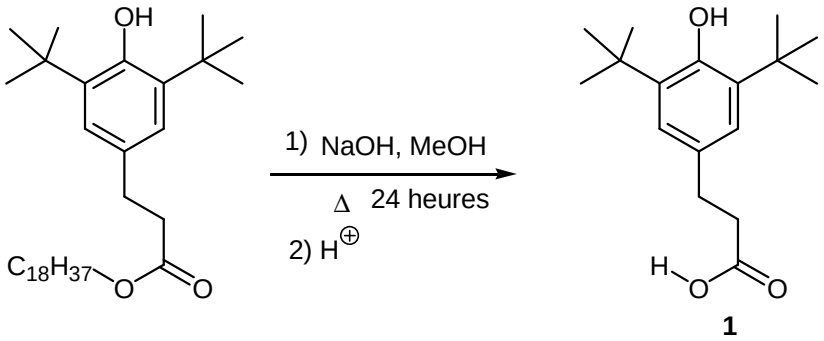
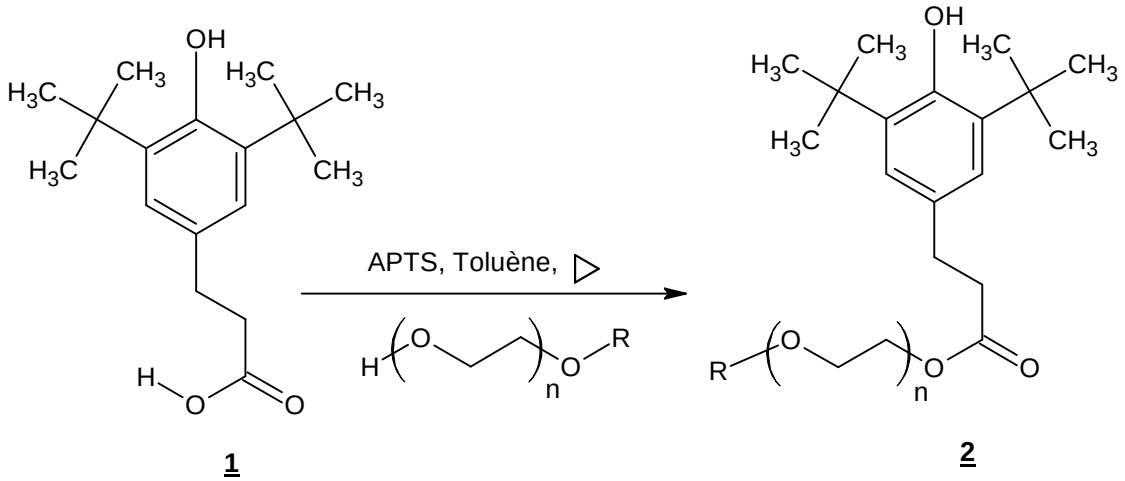


Figure 56. Préparation de l'acide-3-(3,5-di-*ter*-butyl-4-hydroxyphényl)-propionique

Les composés amphiphiles finaux sont obtenus par estérification de cet acide par différents motifs polyoxyéthylèniques de longueur variable afin de moduler la balance hydrophile-lipophile. Il est possible d'obtenir majoritairement le monoester ou le diester de polyéthylèneglycol (PEG) en ajustant les quantités.

En présence d'un large excès de PEG, le mono-ester se forme majoritairement (Tableau 3). L'excès de PEG est aisément éliminé par différents lavages par une solution aqueuse de bicarbonate de sodium. Les différents esters synthétisés ainsi que les rendements obtenus sont rapportés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Formation du monoester polyoxyéthylènique



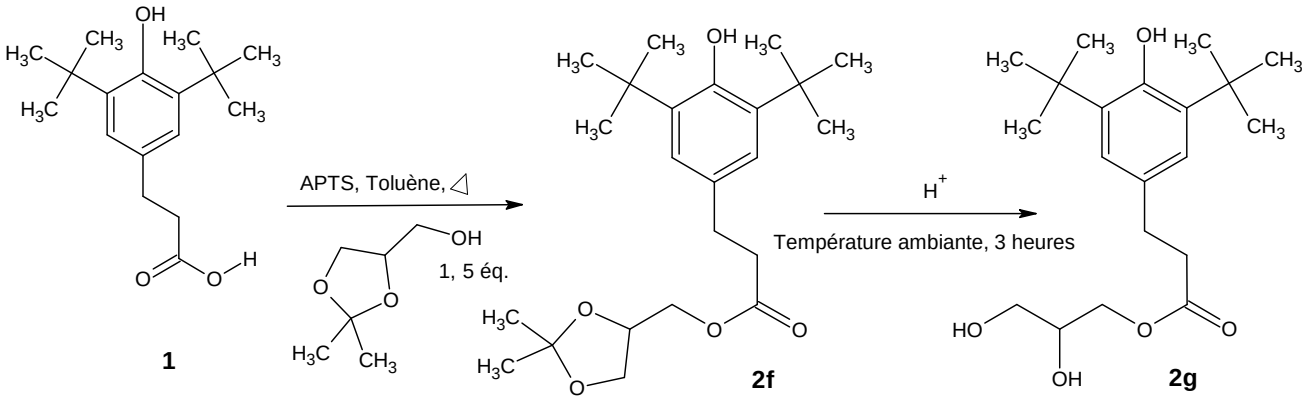
Produit	*n*	*R*	*Rendement (%)*	*Aspect*
2a	2	Me	100	Liquide
2b	2	H	96	Liquide
2c	~ 4 (PEG200)	H	99	Liquide
2d	~ 8 (PEG400)	H	56	Solide visqueux
2e	~ 12 (PEG600)	H	60	Solide visqueux

Les rendements obtenus sont relativement élevés à l'exception des monoesters du PEG 400 et PEG 600. Ceci s'explique probablement par une différence de solubilité plus marquée pour les esters de PEG de petites tailles permettant une séparation par lavage plus efficace, alors que les PEG de masses moléculaires plus élevées augmentent la solubilité dans l'eau du produit final et diminue l'efficacité de séparation de l'excès de PEG par lavage.

La majorité de produits synthétisés sont pour la plupart des liquides. Cet aspect devient de plus en plus visqueux avec l'augmentation du nombre de motifs polyéthoxyléniques associés. En effet, les produits monoesterifiés ayant un nombre de motifs au-dessus de 8 se présentent sous la forme de solides visqueux. Cela rend difficile la détermination de points de fusion (PF).

La réaction à également été étendue au solkétal (Tableau 4). L'estérification a lieu en présence d'un léger excès d'alcool. Ces composés sont par la suite valorisés après hydrolyse du motif acétal protecteur conduisant ainsi aux composés **2g** (Tableau4).

Tableau 4. Formation du monoester polyoxyéthylènique

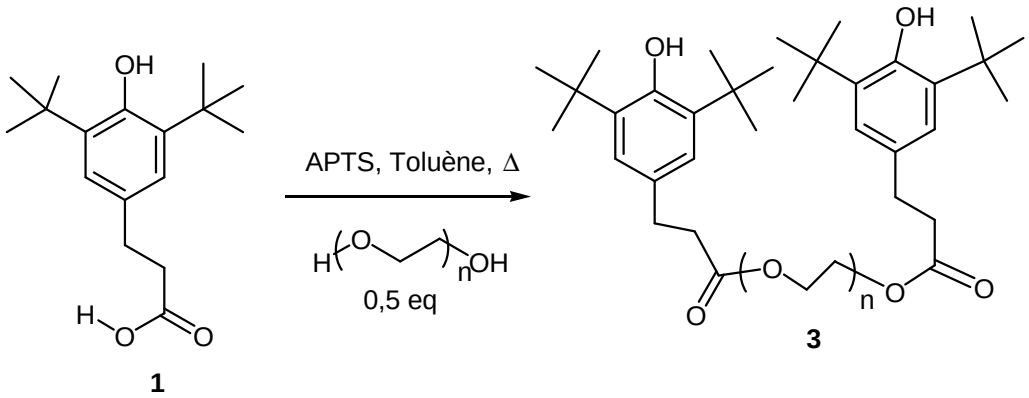


Produit		*Rendement (%)*	*Aspect*
2f	Solketal	100	Liquide
2g	Glycérol	98	Liquide

Les composés **2g** pourront par la suite permettent de greffer d'autres molécules au niveau du motif glycérol.

Les diesters sont obtenus en réduisant la quantité de polyéthylène glycol de façon à utiliser 2 équivalents molaire d'acide-3-(3,5-di-*ter*-butyl-4-hydroxyphényl)-propionique. Le Tableau 5 rapporte les différents esters synthétisés ainsi que les rendements obtenus.

Tableau 5. Formation du diester



Produit	*n*	*Rendement (%)*	*Aspect*	*PF (°C)*
3a	~ 8 (PEG400)	100	Solide visqueux	-
3b	~ 43 (PEG4000)	94	Solide	60
3c	~ 90 (PEG10000)	99	Solide	62

De même que précédemment les composés obtenus n'ont pas le même aspect suivant le nombre de motifs polyéthoxylés associés. L'aspect visqueux du composé **3a** ne permet pas une parfaite détermination de son point de fusion car le produit s'étale sur le banc KOFLER et présente une bande large (56 à 60 °C). Seuls les composés **3b-c** se présente sous forme de solide blanc à point de fusion fixe.

III.2.3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

III.2.3.1. Comportement en solution aqueuse : propriétés de surface

La solubilité dans l'eau des tensioactifs non ioniques incluant un motif BHT dépend de la structure et du nombre de motifs éthoxylés associés. Elle est inférieure à 10^{-3} mol.L^{-1}, dans l'eau à

pH 7, pour les composés monoesters **2a-e** et le diesters **3a** incluant un motif polyéthylène glycol (PEG) égale à 8 unités éthoxylés pour deux motifs BHT.

L'étude de la tension superficielle des solutions aqueuses a été réalisée avec trois des composés synthétisés : les deux monoesters (**2d** et **2e)** incluant respectivement un PEG 400 et un PEG 600, et le diester (**3b**) incluant un polyéthylène glycol 4000. La Figure 57 reporte l'évolution de la tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration des dérivés amphiphiles (**2d**, **2e** et **3b**)**,** les concentrations agrégatives critiques et les surfaces par têtes polaires**.**

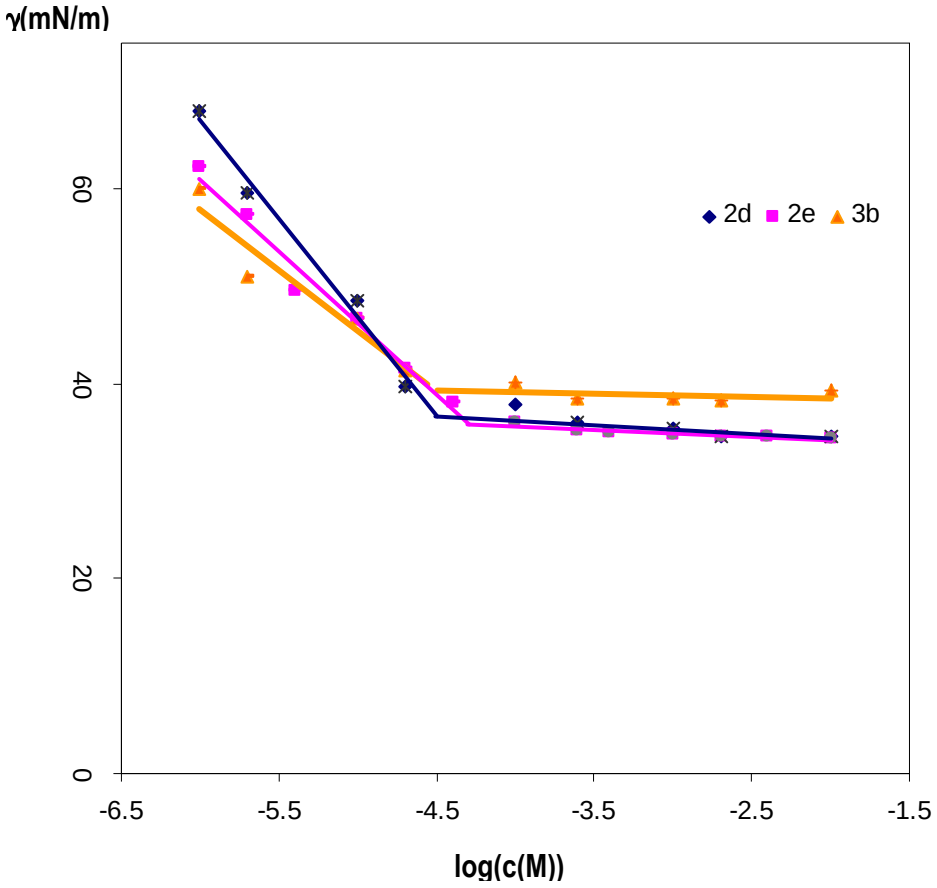


Figure 57. Evolution de la tension superficielle en fonction de la concentration agregatique critique CAC

Tableau 6. Tension superficielle et concentration agrégative critique (CAC) des dérivés amphiphiles **2d**, **2e** et **3b**

Code Produit	γ_{CAC} *(mN/m)*	*CAC* 10^{-5}*(mol/L)*	Γ *(mol/cm*^{2}*)*	σ *(Å*^{2}*/molécule)*
2d	34	5	$3{,}58.10^{-6}$	46, 5
2e	35	10	$4{,}86.10^{-6}$	34
3b	39	2,5	$3{,}01.10^{-6}$	55

Les composés **2d**, **2e** et **3b** ont un comportement de tensioactifs non ioniques hydrogénés classiques. Les valeurs de γ obtenues indiquent des abaissements par rapport à l'eau (γ_{H2O} = 72 mN/m) jusqu'aux alentours de 35 mN/m.

L'augmentation de la longueur du motif hydrophile entraîne une légère augmentation de γ à la concentration critique (34 mN/m pour un PEG de 400 et 35 mN/m dans le cas du PEG 600). Cette augmentation est encore plus nette avec le diester **3b** **(**incluant un polyethylène glycol 4000) pour lequel la tension superficielle est de 39 mN/m. Ce phénomène est observé avec d'autres composés amphiphiles du même type relevés dans la littérature **(**Wassermann *et al.,* 1992 ; Allouch *et al.,* 1996 ; Neogi et Munden, 2007).

On peut donc comparer le comportement des composés amphiphiles incluant un motif BHT à celui de tensioactifs classiques de type CnHn(EO)m où (EO) est un motif oxyéthylènique (Buzier, 1981 ; Ravey, 1988 ; El Moujahid, 1993). Le Tableau 7, regroupe quelques valeurs caractéristiques des composés CnHn(EO)m.

Tableau 7. Tension superficielle et concentration agrégative critique (CAC) des dérivés amphiphiles relevés dans la littérature

Tensioactif	*CMC.*10^5 *(mol/L)*	γ_{CAC} *(mN/m)*	σ *(Å*^{2}*/molécule)*
$C_{10}H_{21}(EO)_3$	60	30	-
$C_{10}H_{21}(EO)_4$	68	30	-
$C_{12}H_{25}(EO)_4$	4	32	-
$C_{12}H_{25}(EO)_5$	6,5	32	56
$C_{12}H_{25}(EO)_6$	8,7	32	-

Si l'on observe les résultats obtenus par El Moujahid avec ceux obtenus par les composés amphiphiles **2d**, **2e** et **3b**, on constate:

- que les valeurs de tension superficielle sont légèrement plus importantes que celles des alkyl-polyéthylène glycols. Les composés **2d**, **2e** et **3b**, sont ainsi plus hydrophobes que les composés CnHn(EO)m ;

- que les surface par tête polaire sont sensiblement du même ordre de grandeur (σ (Å/molécule): 55 (**3b**) ; 56 ($C_{12}H_{25}$ $(EO)_5$).

La concentration agrégative critique augmente également avec la longueur du motif hydrophile. En effet, en ce qui concerne les monoesters **2d** et **2e**, correspondant respectivement à un nombre moyen de motifs oxyéthylèniques de 9 et 13 ; un facteur 2 est observé entre les valeurs de CAC. Ce comportement semble logique dans la mesure où la partie hydrophile est fortement augmentée.

Pour le composé **3b**, la longueur du PEG 4000 compense en partie la présence de deux motifs esters hydrophobes. Le composé **3b** est plus hydrophile que les monoesters (**2d** et **2e**) mais présente cependant des propriétés tensioactives. La concentration critique est deux fois plus faible que celle du **2d**.

Nous avons choisi les monoesters (**2d** et **2e**) pour la suite de l'étude des propriétés biologiques concernant la formulation de produits de préservation du bois.

III.2.3.2. Propriétés antioxydantes

Avant de déterminer les propriétés antioxydantes de nos différents composés, nous avons tout d'abord étudié le comportement du BHT choisi comme composé modèle représentatif de ces phénols encombrés. Pour cela, différentes quantités de BHT ont été mises en contact de linoléate de méthyle obtenu à partir d'Estorob (mélange d'esters méthyliques d'huiles végétales commercialisé par la société Novance contenant majoritairement du linoléate de méthyle) en présence d'un amorceur radicalaire et l'inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle quantifiée en mesurant l'inhibition de la consommation d'oxygène (Figure 58).

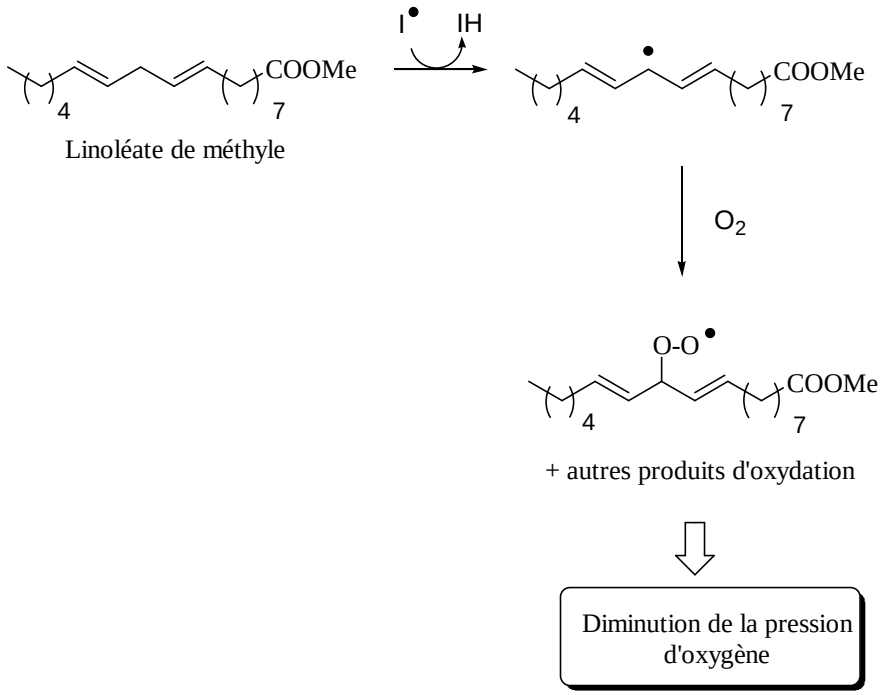


Figure 58. Diminution de la pression d'oxygène due à l'oxydation du linoléate de méthyle

Les résultats obtenus avec différentes concentrations de BHT sont rapportés dans la Figure 59.

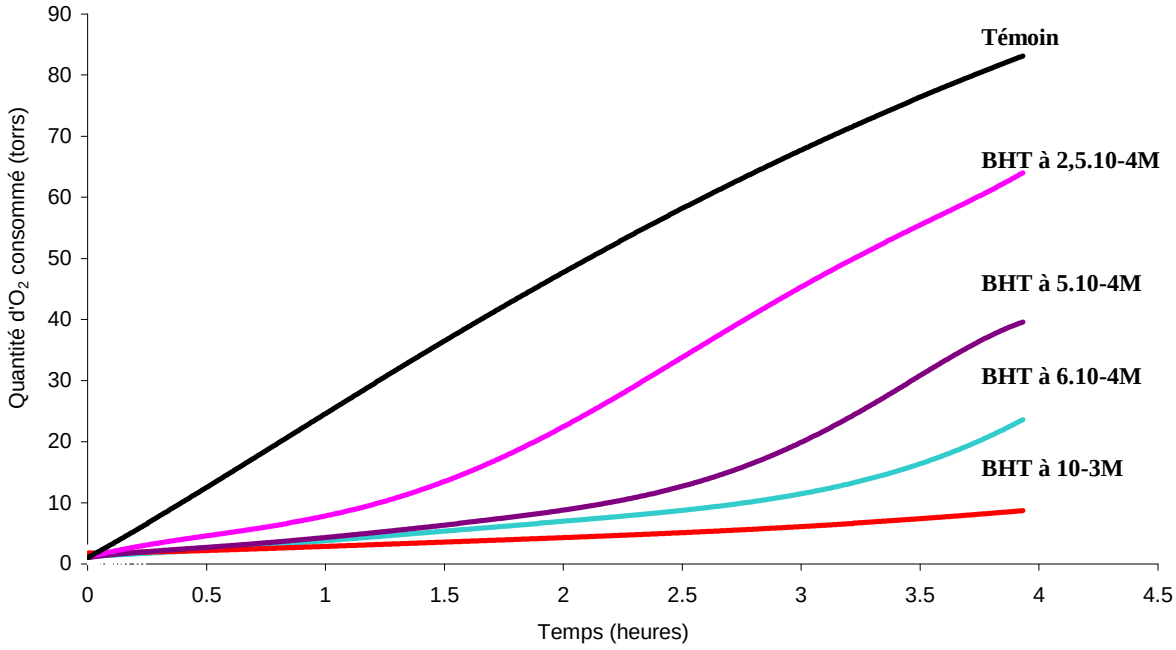


Figure 59. Effet de différentes concentrations de BHT sur l'inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle

En absence d'antioxydant, l'oxydation du linoléate de méthyle débute dès le début de la mise en contact des réactifs et se poursuit de façon linéaire et constante par la suite. La présence de BHT, antioxydant sacrificiel, permet de retarder le début de l'oxydation inhibant ainsi temporairement la consommation d'oxygène. Le temps d'inhibition observé est directement lié à la concentration de l'antioxydant. D'après l'allure des différentes courbes, nous avons choisi de travailler par la suite à une concentration de 5.10^{-4} M correspondant à des temps d'inhibition de quelques heures constituant un bon compromis pour évaluer l'effet des différents composés tout en restant dans des temps d'analyse relativement courts.

Les résultats obtenus avec différents esters de PEG de l'acide-3-(3,5-di-*ter*-butyl-4-hydroxyphényl)-propionique testés à la concentration de 5.10^{-4} M sont rapportés dans la Figure 60.

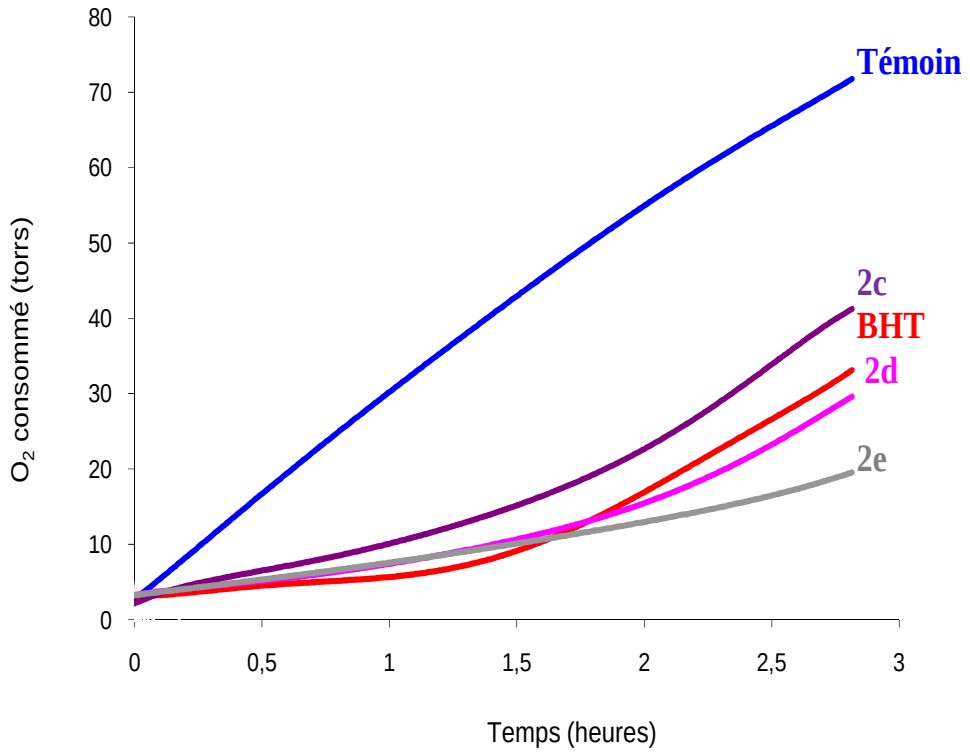


Figure 60. Effet de différents esters de PEG de l'acide-3-(3,5-di-*ter*-butyl-4-hydroxyphényl)-propionique testés à la concentration de 5.10^{-4} M sur l'inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle

La première remarque, qui peut être effectuée à la lecture de ces résultats, est que tous les dérivés de l'acide-3-(3,5-di-*ter*-butyl-4-hydroxyphényl)-propionique, estérifiés par des motifs polyéthylèneglycols, conduisent à une diminution notable de la consommation d'oxygène dans la première phase de la réaction traduisant ainsi leur effet antioxydant. La concentration en motif

phénol encombré étant en théorie la même, peu de différences ont pu être observées entre les temps d'inhibition respectifs des différents produits. Même si l'encombrement stérique provoqué par le greffage d'une chaîne PEG sur la fonction acide peut induire des différences de réactivité au niveau du motif hydroxyle du phénol encombré, il semble que la longueur de la chaîne PEG ne joue qu'un rôle limité.

Les différences observées entre les dérivés du PEG 400 qui présente l'effet antioxydant le moins marqué et celui du PEG 600 qui présente au contraire l'effet le plus marqué sont difficilement explicables et pourraient être dues à des puretés plus ou moins importantes des produits synthétisés conduisant à des concentrations en motifs antioxydant différentes.

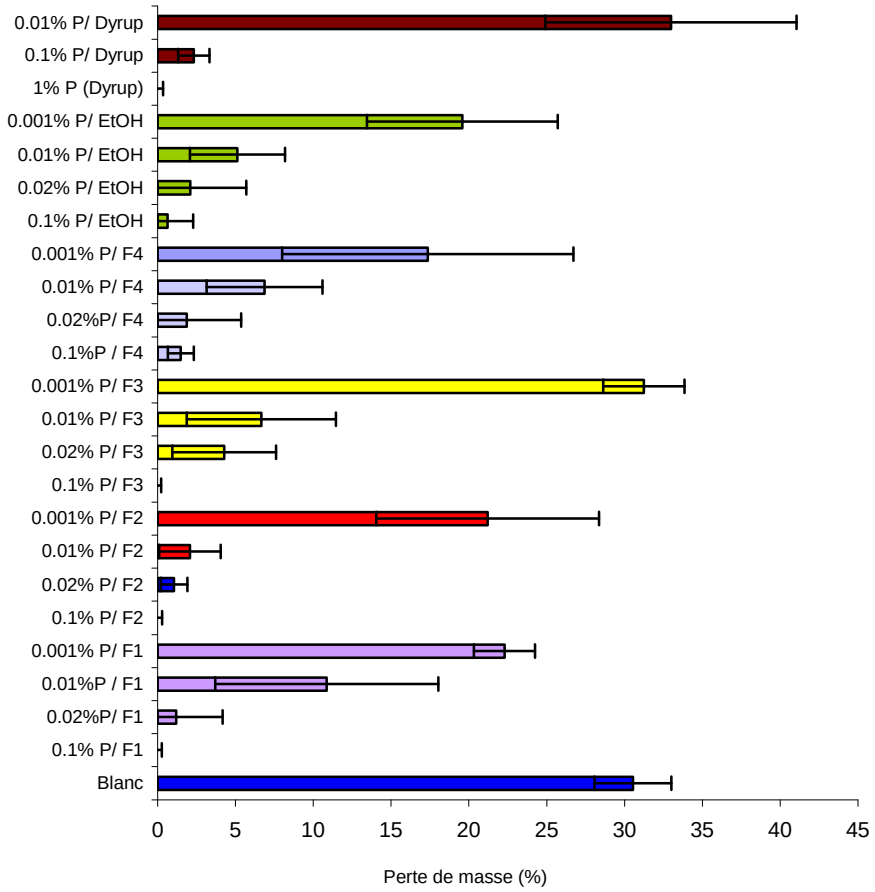
III.2.4. PROPRIETES BIOLOGIQUES

Une série d'essai a ensuite été réalisée en utilisant les dérivés amphiphiles présentant un motif phénol encombré pour préparer différentes formulations contenant du propiconazole. Ces formulations ont été imprégnées dans des éprouvettes de bois de hêtre, puis, les blocs ainsi traités exposés à l'action du champignon *Coriolus versicolor* pendant 16 semaines sur milieu gélosé. A des fins de comparaison, un autre lot d'éprouvettes a été traité par une formulation de référence utilisant le Simulsol 5815 S comme tensioactif. La composition de chacune des solutions testées est donnée ci-dessous :

- Formulation 1 : Propiconazole à 0,1 % / Dowanol DPM (0,15 %) / Dérivé du PEG 400 à 0,17 % dans l'eau
- Formulation 2 : Propiconazole à 0,1 % / Dowanol DPM (0,15 %) / Dérivé du PEG 600 à 0,17 % dans l'eau
- Formulation 3 : Propiconazole à 0,1 % / Dowanol DPM (0,15 %) / Simulsol 5815 S à 0,17 % dans l'eau.
- Formulation 4 : Propiconazole à 0,1 % / BHT à 0,17 % dans l'éthanol

Deux autres séries d'imprégnation ont également été envisagées : une série impliquant l'utilisation d'un concentré à 10 % en propiconazole fourni par Dyrup (10 % de propiconazole, 15 % d'éther monométhylique de dipropylèneglycol (Dowanol DPM) comme co-solvant et 17 % de tensioactif à base ricinoléate de glycérine éthoxylée (Simulsol 5815 S) et une solution de propiconazole seul dans l'éthanol.

Les résultats sont rapportés dans la Figure 61.



F1 = Formulation 1 : Propiconazole / Dérivé du PEG 400 – F2 = Formulation 2 : Propiconazole / Dérivé du PEG 600 – F3 = Formulation 3 : Propiconazole / Simulsol 5815 S – F4 = Formulation 4 : Propiconazole / BHT – P = Propiconazole.

Figure 61. Pertes de masse des éprouvettes de hêtre traitées avec différentes formulations après 16 semaines d'exposition à *Coriolus versicolor*.

A 0,1 % de propiconazole, toutes les solutions ou formulations testées présentent une bonne efficacité vis à vis de l'agent de pourriture testé. En effet, dans tous les cas, les pertes de masse mesurées sont nulles ou très faibles, alors que les éprouvettes non traitées sont fortement dégradées (perte de masses supérieures à 30 %). Ces résultats sont en accord avec le seuil d'efficacité du propiconazole rapporté habituellement. A 0,02 %, les solutions renfermant un antioxydant semblent présenter une efficacité légèrement supérieure par rapport aux formulations utilisant le Simulsol 5815 S. Cependant, il convient de prendre ces résultats avec précaution du fait de l'importance des

écarts type mesurés. A plus faibles concentrations, les effets des constituants des différentes formulations sont plus difficiles à évaluer, même si la Formulation F2 réalisée à partir d'un tensioactif antioxydant (dérivé du PEG 600) semble présenter à nouveau les meilleures performances. A des concentrations de 0,001 %, aucune des formulations testées ne présente d'efficacité contre le développement du champignon.

III.3. SYNTHESE ET EVALUATION DE NOUVEAUX TENSIOACTIFS INCLUANT UN MOTIF ACIDE ASCORBIQUE

Une autre stratégie pour obtenir des tensioactifs antioxydants cationiques a consisté à utiliser l'acide ascorbique comme partie antioxydante. L'activité de l'acide ascorbique nous a permis de l'associer à différents composés azoté apportant les propriétés tensioactives. Deux approches ont été envisagées.

La premier correspond à la réaction entre l'acide ascorbique et une amine grasse ; la deuxième à la réaction entre l'acide ascorbique et un dérivé composé résultant de la condensation de l'éthylène diamine et d'un acide gras.

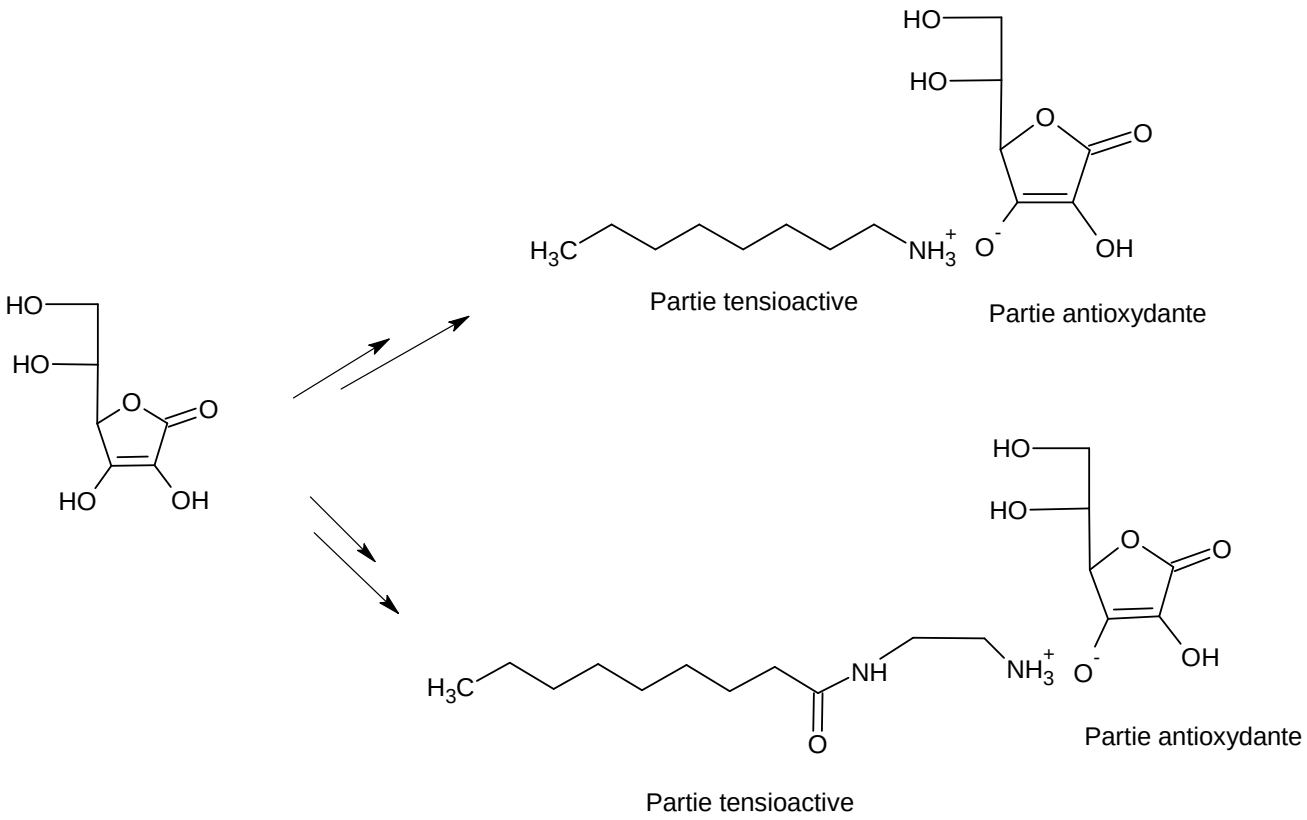


Figure 62. Réaction avec l'acide ascorbique

III.3.1. SYNTHESE

III.3.1.1. Réaction entre l'acide ascorbique et une amine grasse : « dérivés d'amines grasses de type AaCn »

L'acide ascorbique est une molécule complexe présentant plusieurs sites réactionnels électrophiles (Berg et Kiss, 1976). En nous basant sur des travaux réalisés précédemment au sein de l'équipe ou relevés dans la littérature (Turkova, 1959 ; Pedersen *et al.*, 1978 ; Berthod *et al.*, 1983 ; Fuersteman *et al.*, 1991 ; Kida *et al.*, 1994 ; Emmanouil *et al.*, 1998; Alliot, 1999 ; Frykman *et al.*, 2000 ; Park *et al.*, 2003 ; Balland, 2003 ; Aury *et al.*, 2004 ; Ella-Menye *et al.*, 2005), nous avons envisagé dans un premier temps de condenser une amine grasse sur la lactone de l'acide ascorbique (Figure 67) (Rumpf et Marlier, 1958 ; Mori et Sakamoto, 1975 ; Shao *et al.*, 1993 ; Mokhtar *et al.*, 1994 ; Gan et Seib, 1991,1998 ; Skiera *et al.*, 2004).

Celui-ci a donc été mis au contact d'amines grasses comportant différentes longueurs de chaîne carbonée, dans un mélange méthanol/eau, à différentes températures. Après élimination du solvant, et différents lavages par de l'éther diéthylique, un solide plus ou moins coloré est isolé et caractérisé.

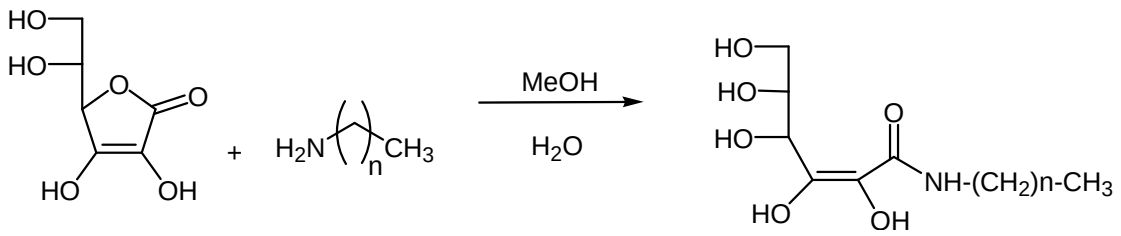


Figure 63. Ouverture potentielle de la lactone

Cependant aucune ouverture du cycle lactonique n'a pu être observée, quelques soient la température ou la quantité d'amine utilisée. Les produits isolés correspondent en fait aux ammoniums d'ascorbate résultant de la réaction acide base entre l'hydrogène le plus acide de l'acide ascorbique et l'amine (Figure 64).

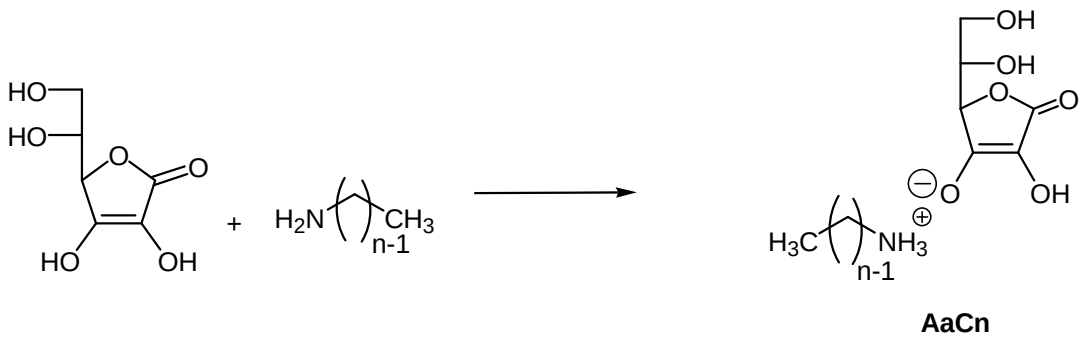


Figure 64. Réaction acide base

Le schéma présentant les différentes acidités de l'acide ascorbique est rapporté par la Figure 65.

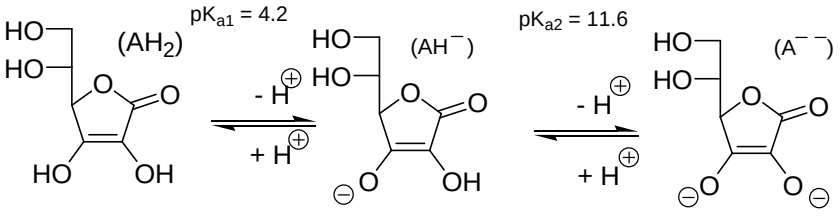


Figure 65. Les différentes acidités de l'acide ascorbique

L'acide ascorbique comporte 4 motifs hydroxyles en position 2, 3, 5 et 6 présentant une acidité différente l'hydroxyle en position 2 correspond à un pKa de 11,6 et ceux en position 5 et 6 ont une acidité comparable à celle d'alcools primaires et secondaires classiques (Emmanouil *et al.,* 1998 ; Lo Nostro *et al.*, 2000a,b ; Ella-Menye *et al.,* 2005). Le motif OH en position 3 est le plus acide (pKa = 4,2), en raison de la forte stabilisation de la base conjuguée.

Ce résultat est en accord avec d'autres travaux relevés dans la littérature (Jernow *et al.,* 1979 ; Hideyuki *et al.,* 1998 ; Szymula et Narkiewicz-Michalek, 2003 ; Jiang *et al.*, 2004 ; Dikusar *et al.,* 2004).

L'intégrité du motif vitamine C, connue comme molécule relativement sensible, a été vérifié en utilisant différentes méthodes spectroscopiques. L'analyse RMN du proton indique des signaux assez proches de ceux observés pour l'acide ascorbique seul, correspondant aux différents atomes d'hydrogène du cycle lactonique et de la chaîne latérale. Aucune oxydation notoire du cycle n'a donc eu lieu durant la réaction. L'analyse RMN du carbone 13 conduit aux mêmes conclusions en indiquant des signaux en accord avec la structure du sel d'ascorbate. L'intégrité du motif de la vitamine C à également été vérifié par spectroscopie UV visible (Depew *et al.*, 1984 ; Salghi, 2006).

Les sels d'ammonium présentent un spectre UV-visible pratiquement similaire à celui de l'acide ascorbique (λmax = 256 nm à une concentration de 10^{-4} M dans l'eau) comme le montre la Figure66.

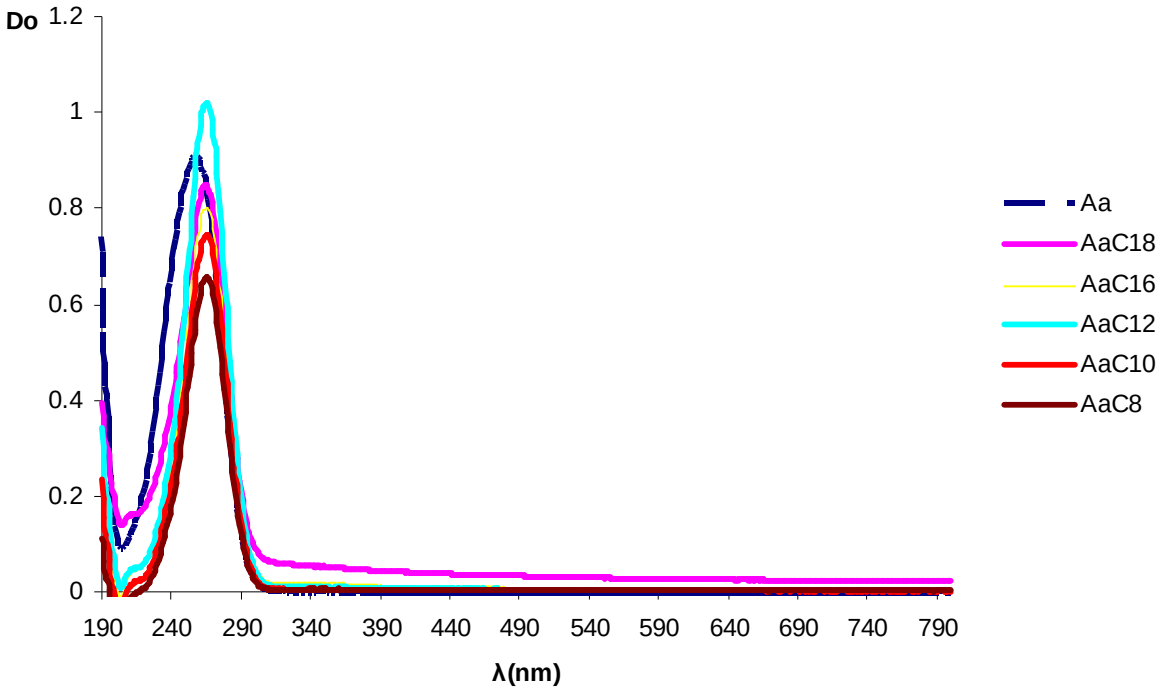


Figure 66. Spectres d'absorption UV visibles des dérivés amphiphiles de l'acide ascorbiques (AaCn) à 10^{-4} mol.L^{-1}.

Les dérivés amphiphiles de l'acide ascorbique (AaCn) absorbent la lumière ultraviolette et visible à la même longueur d'onde que l'acide ascorbique (Aa**)** à λ= 256nm. La chaîne aminocarbonée n'influence pas sur l'absorption du composé AaCn nouvellement formé. Les différents produits synthétisés sont rassemblés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Différents ascorbates d'ammonium synthétisés

Produit	*Code du produit*	*Amine*	*Aspect du produit*	*Rendement (%)*	*PF (°C)*
4a	AaC_4	Butylamine	Solide visqueux brun	100	-
4b	AaC_8	Octylamine	Solide jaune	100	65
4c	AaC_{10}	Decylamine	Solide jaune	100	67,5
4d	AaC_{12}	Dodecylamine	Solide jaune	99	68
4e	AaC_{16}	Hexadecylamine	Solide blanc	99	69
4f	AaC_{18}	Octadecylamine	Solide blanc	98	70

Ces molécules se classent ainsi dans la catégorie des sels tensioactifs cationiques. Elles se présentent sous forme de solides plus ou moins colorés selon la longueur de leur chaîne carbonée et sont obtenues avec des rendements pratiquement quantitatifs (Tableau 8).

III.3.1.2. Réaction entre l'acide ascorbique et un composé dérivé de l'éthylène diamine et d'un acide gras : « dérivés bimodulaires d'acides gras de type AaEdCn »

La deuxième série de molécules synthétisées de cette famille concerne les produits de type ascorbate de 2-alcanoylamidoéthyl-ammonium (AaEdCn).

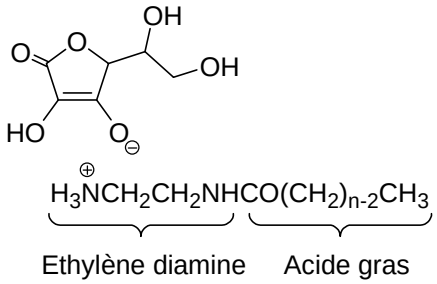


Figure 67. Ascorbate de 2-alcanoylamido-éthylammonium (AaEdCn)

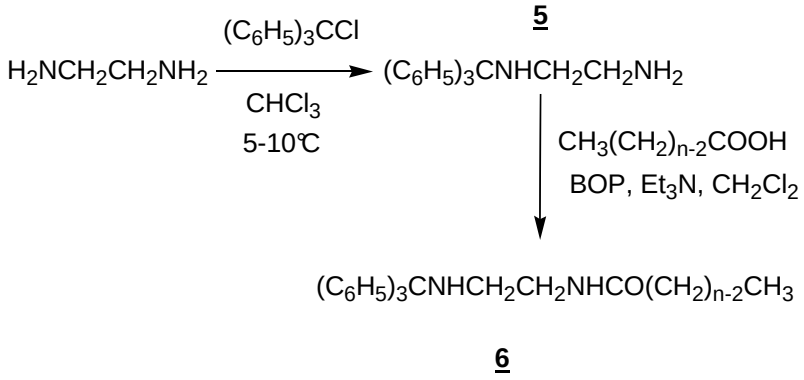
Ce type de structure présente l'avantage de ne pas avoir recours à l'utilisation d'amines grasses relativement onéreuses en utilisant un pont éthylène diamine permettant de fixer directement les acides gras (Kiss *et al.*, 1980 ; Yang et Seib, 1992 ; Schweikert et Sambale, 1993 ; Yazawa *et al.*, 1994 ; Perreux *et al.*, 2002 ; Cuvelier *et al.*, 2004). De plus, les propriétés chélatantes du motif éthylènediamine pourraient permettre de réduire l'effet pro-oxydant des cations métalliques par complexation.

L'objectif est de tester la méthode avec l'éthylène diamine pour l'étendre par la suite à des composés diaminés de ce type, issus de ressources renouvelables, tels que la lysine par exemple (King *et al.*, 1980 ; Fahrni et Siegfried, 1983 ; Lu *et al.*, 1984 ; Mizushima *et al.*, 1984 ; Mehlhorn *et al.*, 1990 ; Cuvelier *et al.*, 2004).

Dans un premier temps, notre but a été de préparer les produits sans chercher à mettre au point une synthèse « verte ». Nous avons donc opté pour l'utilisation de composés protégés au niveau d'une des fonctions amines de l'éthylène diamine pour greffer une seule chaîne grasse (Baylocq *et al.*, 1983 ; Cabelli *et al.*, 1984 ; Dalpiaz *et al.*, 2005).

Le schéma réactionnel est décrit ci-après (Tableau 9). L'éthylène diamine est tout d'abord mono protégée sélectivement en présence de chlorure de trityle (Malgesini, 2003) puis amidifiée par couplage de type peptidique par différents acides gras. Le Tableau 9 reporte les rendements globaux des produits résultants de la réaction de couplage au BOP.

Tableau 9. Couplage de l'acide gras avec l'éthylène diamine mono protégée

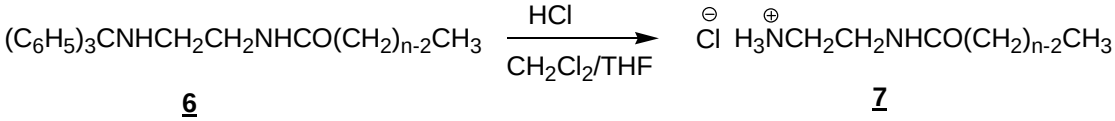


Produit	*Acide gras*	*Rendement global (%)*	*Aspect du produit*	*PF (°C)*
6a	Acide caprylique	97	Solide brun	26,5
6b	Acide caprique	97,5	Solide brun clair	41
6c	Acide laurique	98	Solide blanc	43

Les produits synthétisés sont obtenus avec des rendements excellents. Leur aspect au niveau coloration évolue en fonction du nombre de motif CH_2 en plus dans la chaîne latérale. Plus l'acide est long, plus le produit a tendance à se présenter sous forme de solide jaune de plus en plus clair voir même vers un aspect blanc.

Le déblocage par HCl dans un mélange tétrahydrofurane/dichlorométhane permet de libérer l'ammonium. Le Tableau 10 rapporte les résultats de la réaction de déprotection du motif trityle.

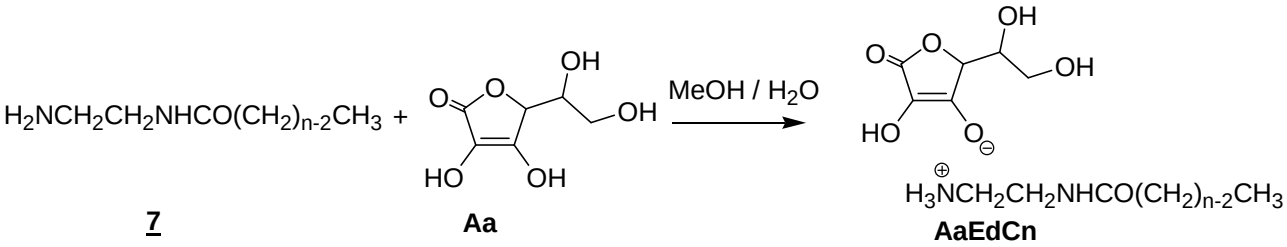
Tableau 10. Produits résultants de la déprotection du motif trityle



Produit	*Acide gras*	*Rendements (%)*	*Aspect du produit*	*PF (°C)*
7a	Acide caprylique	98	Solide blanc	16,5
7b	Acide caprique	98,5	Solide blanc	31
7c	Acide laurique	99	Solide blanc	33

Les rendements obtenus dans cette étape sont aussi excellents que ceux obtenus précédemment. Les produits obtenus se présentent sous la forme de solides blancs. Les composés **7a**, **7b**, et **7c** sont repris dans une solution d'acétate d'éthyle puis basifiés par addition d'une solution aqueuse de Na_2CO_3. Après extraction, séchage par du sulfate de magnésium et évaporation du solvant sous pression réduite, le résidu qui correspond à l'amine est repris par un mélange eau/méthanol (1/9) avant de le faire réagir avec l'acide ascorbique. Le sel est isolé après 1 heure d'agitation à température ambiante. Le Tableau 11 rapporte les résultats de la réaction acido-basique entre le composé amine bimodulaire et l'acide ascorbique.

Tableau 11. Produits résultant de la synthèse des dérivés amphiphiles d'acides gras



Produit	*Code Produit*	*Acide gras*	*Rendements globaux (%)*	*Aspect du produit*	*PF (°C)*
8a	$AaEdC_8$	Acide caprylique	99	Solide blanc	82,5
8b	$AaEdC_{10}$	Acide caprique	99,5	Solide blanc	86,5
8c	$AaEdC_{12}$	Acide laurique	77,5	Solide blanc	95

Les produits synthétisés se présentent sous forme de solides blancs et ont été là encore obtenus avec de très bons rendements (Tableau 11).

III.3.2. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES

III.3.2.1. Comportement dans l'eau : propriétés de surface

a) « Dérivés amphiphiles d'amines grasses »

Avant de déterminer les propriétés tensioactives, nous avons évalué la solubilité dans l'eau de différents composés. On constate tout d'abord que ces sels d'ammonium sont moins solubles dans l'eau que l'acide ascorbique (solubilité de 1,8 M). Ceci s'explique probablement par l'apport d'une chaîne hydrophobe non compensé par la présence de l'ammonium (Neogi et Munden, 2007).

Comme précédemment, les propriétés tensioactives ont été évaluées par mesure de la tension superficielle des solutions aqueuses des différents sels par la méthode de Wilhelmy.

Les courbes obtenues sont reportées dans la Figure 68 et les principales caractéristiques sont reportées dans le Tableau 12. La rupture de pente montre que ces composés sont tensioactifs et les composés permettent d'obtenir un abaissement de la tension superficielle jusqu'à 25 mN/m.

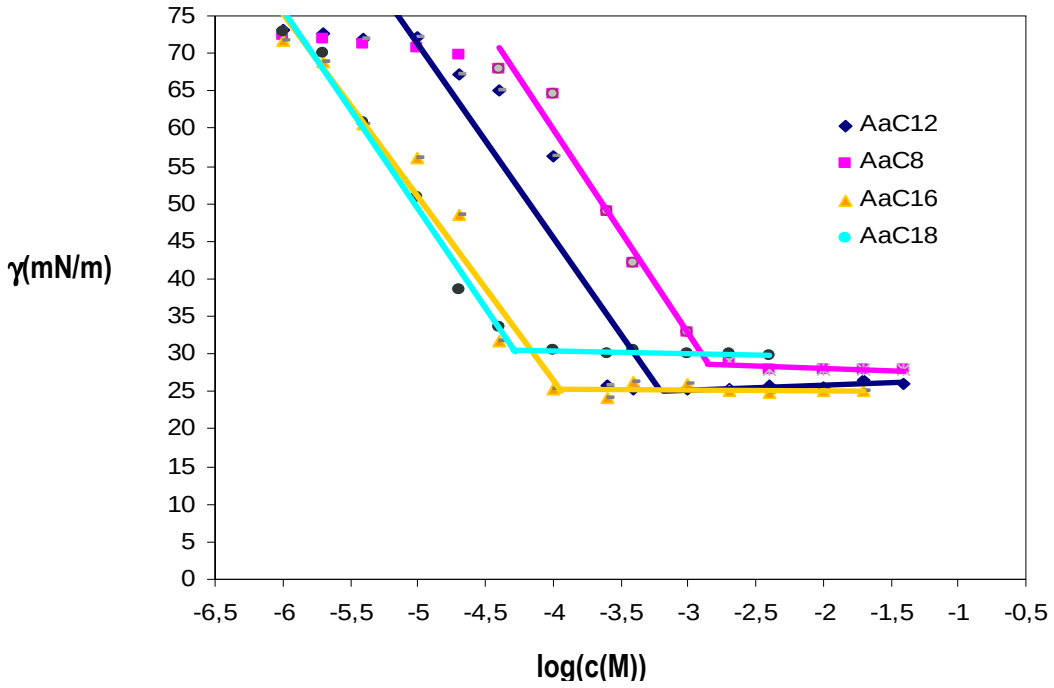


Figure 68. Courbes de tension superficielles des ascorbates d'ammonium

Tableau 12. Caractéristiques physicochimiques des ascorbates d'ammonium

Produit	*Code Produit*	*Amine*	*Solubilité dans l'eau à 25°C (M)*	γ_{CAC} *(mN/m)*	*CAC.10*^{4} *(mol.L*$^{-1}$*)*	σ *(Å*^{2}*/molécule)*
4b	AaC_8	Octylamine	$1{,}0.10^{-1}$	28	17,7	70
4d	AaC_{12}	Dodecylamine	$2{,}3.10^{-1}$	29	4,3	74
4e	AaC_{16}	Hexadecylamine	$3{,}5.10^{-2}$	25	1,1	78
4f	AaC_{18}	Octadecylamine	$6{,}7.10^{-3}$	30	0,5	72

La concentration critique diminue avec la longueur de la chaîne carbonée. Elle varie de 10^{-3} à 10^{-5} mol.L^{-1} environ suivant le nombre de motifs CH_2. Lorsque la chaîne augmente d'un motif CH_2, la CAC diminue d'environ un facteur 4, ce qui est conforme à ce qu'on observe dans le cas d'autres tensioactifs cationiques hydrogénés (Berthod, 1983 ; Smith, 1988 ; Hernandez *et al.*, 1995 ; Barralt et Pouilloux, 1997).

Comparativement, les concentrations critiques des ascorbates d'ammonium sont plus faibles que celles de chlorhydrates de didecyldiméthylammonium (aux alentours de 10^{-3} M). Mais sensiblement

similaires à celles des alcanoates d'ascorbyle rapportées dans la littérature (Andrews et Crawford, 1982 ; Andrews, 1984 ; Barralt et Pouilloux, 1997 ; Palma *et al.*, 2002).
On retrouve également des CAC du même ordre de grandeur que celles observées précédemment avec les dérivés du pipéridinol.

L'évolution du logarithme de la CAC en fonction de la longueur de la chaîne carbonée est représentée sur la Figure 69.

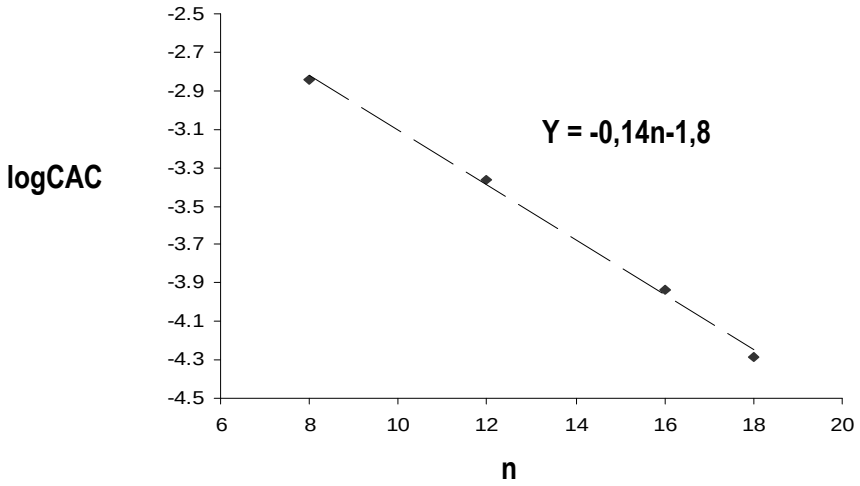


Figure 69. Evolution de la CAC en fonction de la longueur de la chaîne carbonée

Les résultats montrent une relation linéaire qui se traduit par une équation du type log(CAC) = A - Bn où A et B sont des constantes et n correspond au nombre de CH_2. B, correspondant à la pente de la droite est égal à - 0,14 et est à peu près équivalent à la valeur de B obtenue dans le cas du chlorure de didecyldiméthylammonium (B = - 0,22). La valeur de A, de - 1,67 comparativement à 0,75 dans le cas du chlorure de didecyldiméthylammonium, indique que nos composés sont plus hydrophobes (Yamada *et al.*, 1973 ; Avellak *et al.*, 2000).

b) Dérivés bimodulaires d'acides gras de type AaEdCn

L'évolution de la tension superficielle en fonction de la concentration est rapportée dans la Figure 70.

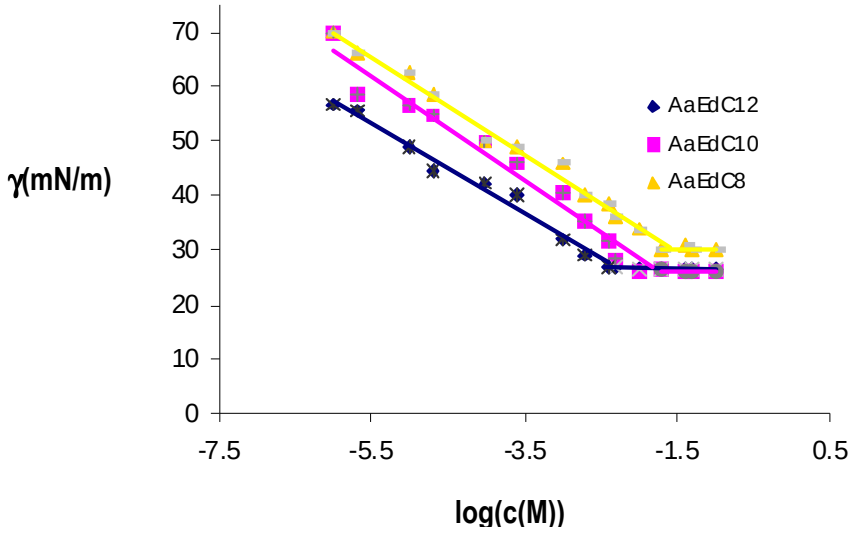


Figure 70. Evolution de la tension superficielle en fonction de la concentration des composés de type AaEdCn

Tableau 13. Tension superficielle et concentration agrégative critique (CAC) des dérivés amphiphiles de type $AaEdC_n$

Produit	*Code Produit*	*γcac(mN/m)*	*CAC.10³ (mol/L)*	*Γ (mol/cm²)*	*σ (Å²/molécule)*
8a	$AaEdC_8$	30,28	26,5	$7,85.10^{-6}$	21,15
8b	$AaEdC_{10}$	31,27	5,2	$8,34.10^{-6}$	19,91
8c	$AaEdC_{12}$	26,78	4,8	$7,27.10^{-6}$	22,82

L'allure des courbes indiquent que les composés ont des propriétés tensioactives. L'addition d'un module de jonction de type éthylène diamine augmente l'hydrophilie des composés puisque les CAC sont plus élevées que celles obtenues avec les ascorbates d'ammoniums. Cette hydrophilie est certainement lié à la présence d'un motif amido supplémentaire qui compense à priori l'ajout de 2 motifs CH_2 (Bilia *et al.*, 2002 ; Balakrishnan *et al.*, 2004).

La Figure 71 reporte l'évolution de la CAC en fonction de la longueur de la chaîne carbonée des composés AaEdCn.

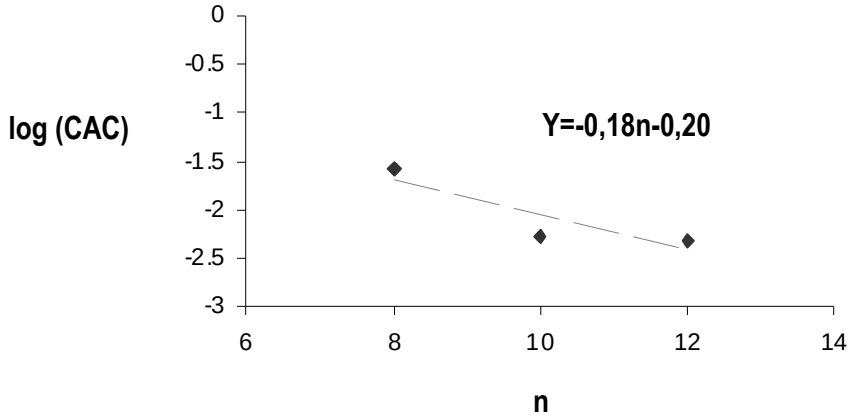


Figure 71. Evolution de la CAC en fonction de la longueur de la chaine carbonée

L'évolution de la CAC en fonction de la longueur de la chaîne carbonée respecte une relation linéaire dont l'équation est de type log(CAC) = - 0,20 – 0,18n où n désigne le nombre de CH_2. La valeur de la pente des composés AaEdCn, de - 0,20, est semblable à celle obtenue dans la littérature avec le chlorure de didecyldiméthylammonium (- 0,22). Les valeurs des pentes de -0,18 pour le cas des AaEdCn et de 0,75 pour le chlorure de didecyldiméthylammonium révèlent là encore que les produits AaEdCn sont plus hydrophobes (Yamada *et al.*, 1973).

Les surfaces par tête polaire sont en accord avec celles retrouvées dans la littérature pour le cas des composés cationiques (Le Perchec, 1994).

III.3.2.2. Propriétés antioxydantes

a) Ascorbate de n-alkyl ammonium (AaCn)

De la même façon que précédemment avec les dérivés amphiphiles incluant un motif BHT, nous avons évalué les propriétés antioxydantes des ascorbates d'ammonium par la méthode au linoléate de méthyle ainsi que par la méthode au DPPH.

- Méthode au linoléate de méthyle

Les courbes de la consommation d'oxygène montrant l'effet des différents ascorbates d'ammonium sur l'oxydation du linoléate de méthyle induite par de l'AIBN sont reportées dans la Figure 72.

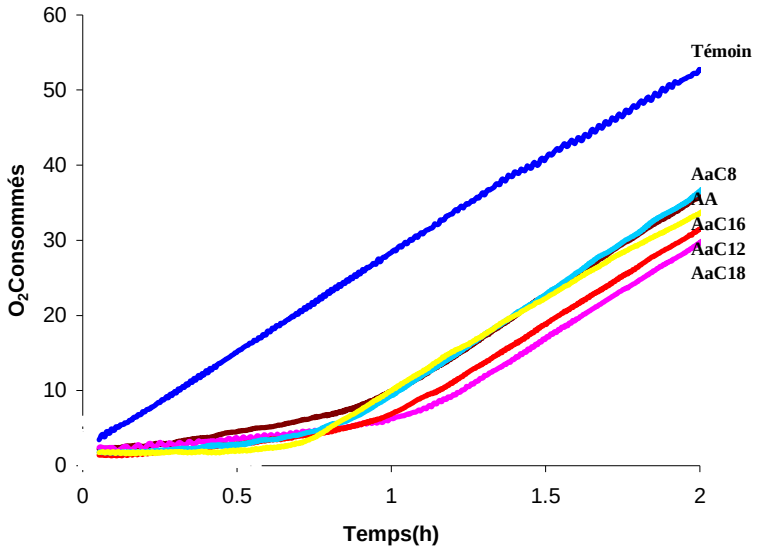


Figure 72. Courbes d'oxydation du linoléate de méthyle en présence des ascorbates d'ammonium

On constate que tous les composés testés retardent l'oxydation du linoléate de méthyle. Chacun de produits AaCn présente donc un effet inhibiteur sur l'oxydation. Les composés synthétisés se comportent comme des antioxydants. Le Tableau 14 rapporte les différents temps (τ) d'inhibition calculés à partir des allures des courbes de la Figure 72.

Tableau 14. Propriétés antioxydantes des ascorbates d'ammonium

Produit	*Antioxydant*	τ^{b} *(min)*
Acide ascorbique	Aa	52
4b	AaC_8	50
4d	AaC_{12}	58
4e	AaC_{16}	44
4f	AaC_{18}	62

[b] *mesures réalisées avec l'estorob comme solution de référence.*

Les temps d'inhibition (τ) sont différents selon le produit testé mais restent relativement proches et sont compris entre 44 et 62 minutes. Il est donc difficile de tirer des conclusions quant à l'influence de la chaîne alkyle puisque certains de ces sels ont une activité antioxydante plus prononcée que l'acide ascorbique, alors que d'autres ont une activité légèrement plus faible.

Cette différente de comportement peut s'expliquer par des puretés légèrement différentes des produits testés conduisant à des quantités de motifs antioxydant légèrement variables en fonction de la longueur de la chaîne alkyle.

- Méthode au DPPH

Les propriétés antioxydantes des sels d'ascorbate ont également été évaluées en utilisant la méthode de DPPH.

Pour chacune des molécules amphiphiles, différentes concentrations ont été préparées et des mesures de cinétiques de réaction à une longueur d'onde donnée ont été effectuées tout en gardant la même concentration en DPPH de 2.10^{-4} M. L'absorbance due au radical du DPPH est alors mesuré puis tracée en fonction de la concentration en composé antioxydant nécessaire pour obtenir une disparition de 50 % du DPPH à l'équilibre. A titre d'exemple, la Figure 73, rapporte l'évolution

de l'absorbance du DPPH (2.10^{-4} M) au cours du temps en présence de différentes concentrations d'AaC_{12} comprises entre $1,2.10^{-5}$ et $9,5.10^{-5}$ M.

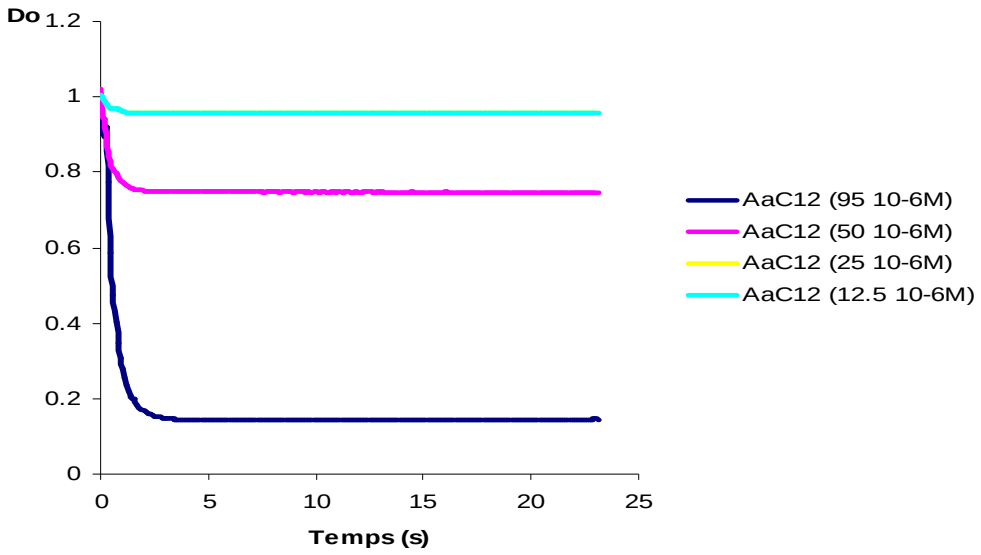


Figure 73. Evolution de la quantité de **DPPH** (2.10^{-4} M) en présence d e différentes concentrations d'AaC_{12}

A partir de ces courbes, il est possible de tracer l'évolution de la disparition du DPPH en fonction de la concentration en composé antioxydant ayant réagi (Figure 74).

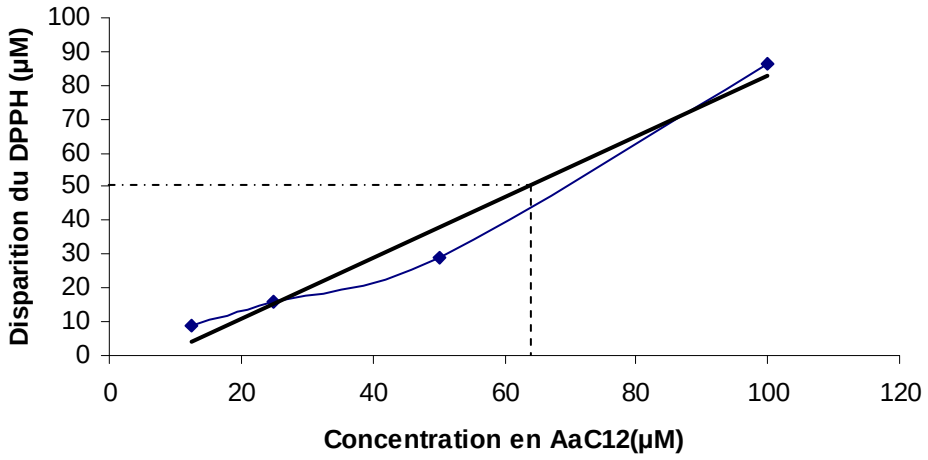


Figure 74. Détermination de IC_{50} de l'AaC_{12}

Il est ainsi possible de déterminer la IC_{50} correspondant à la concentration en composé antioxydant AaC_{12} nécessaire pour obtenir une disparition de 50 % du DPPH à l'équilibre. Les IC_{50} des différents ascorbate d'ammonium de type AaCn sont regroupés dans le Tableau 15.

Tableau 15. Concentration des ascorbates d'ammonium nécessaire à l'inhibition de 50 % de DPPH (2.10^{-4} M)

Produit	*Antioxydant*	*IC_{50} (µmol/l)*
Acide ascorbique	Aa	20,3
4b	AaC_8	53,4
4d	AaC_{12}	63,6
4e	AaC_{16}	44,8
4f	AaC_{18}	40,7

L'IC_{50} de l'acide ascorbique mesurée dans notre étude est pratiquement identique à celle relevée dans la littérature (IC_{50} = 20,8) (Mazor *et al.*, 2006).

Comme le montrent les résultats relevés dans le Tableau 15**,** l'acide ascorbique présente un pouvoir antioxydant plus important que ces dérivés. Aucune corrélation évidente ne peut établie entre ces propriétés antioxydantes et la longueur de la chaîne carbonée. Cependant ces sels présentent une activité antioxydante même si elle est un peu plus faible dans le cas de l'ammonium de dodécyle (AaC_{12}).

D'après la littérature, l'oxydation de l'acide ascorbique conduit à l'acide dehydroascorbique comme produit final d'oxydation. La formation du radical anion est favorisée en raison de sa forte stabilité liée à sa pseudoaromaticité (Buncel *et al.*, 1965 ; Abe *et al.*, 1987) et c'est cette forte stabilité qui permet de déplacer l'équilibre vers sa formation (Njus *et al.*, 1991).

Si l'on considère le mécanisme d'oxydation de l'acide décrit dans la littérature (Njus *et al.*, 1991), il n'est pas surprenant que les sels correspondants puissent piéger les radicaux initiés par l'AIBN ou le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle. En effet, un mécanisme d'oxydation similaire à

celui décrit pour l'Aa peut-être proposé dans le cas des composés AaCn. Le schéma réactionnel de cette oxydation est présenté par la Figure 75.

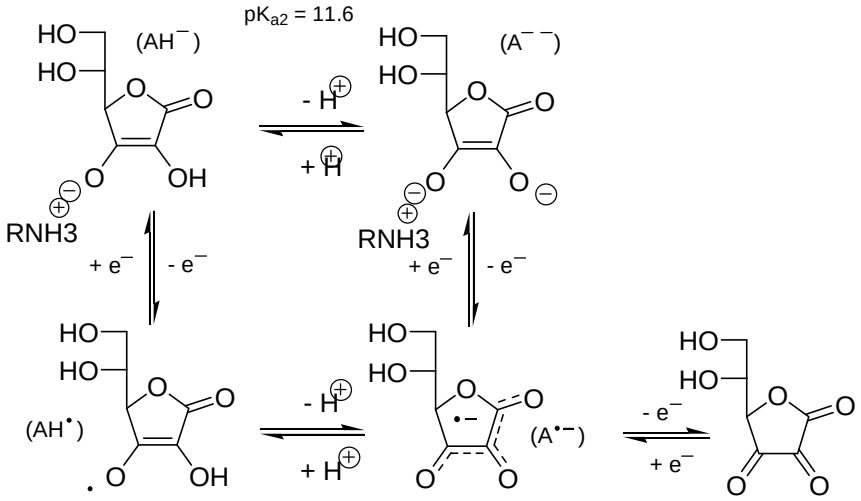


Figure 75. Mécanisme d'oxydation des composés AaCn

Le fait que ces sels ont une activité antioxydante moins prononcée que celle de l'acide ascorbique peut s'expliquer par une moins bonne accessibilité liée à un encombrement plus important en raison de la présence de l'ammonium et donc un transfert électronique via le radical issu du DPPH plus ou moins gêné (Buttner, 1988 ; Avellar *et al.*, 2000).

Une autre explication à ces résultats peut également être avancée. En effet l'acide ascorbique cède deux atomes d'hydrogène au DPPH, or l'atome d'hydrogène en position 3 n'est plus présent dans les ascorbates d'ammonium, ce qui peut expliquer le fait d'observer pour ces composés une IC_{50} environ deux fois plus importante (Climent *et al.*, 1994 ; Chengxin *et al.*, 1999).

Cet effet n'a pas été observé dans le cas de la méthode au linoléate de méthyle mais il a été montré ultérieurement que les corrélations entre les 2 méthodes étaient relativement faibles (Diouf *et al.*, 2002).

b) Dérivés bimodulaires d'acides gras (AaEdCn)

- Méthode au linoléate de méthyle

Des essais en présence d'estorob on été réalisés avec les composés ascorbates de n-alkyl ammonium (AaEdCn) et les résultats sont répertoriés dans le Tableau 16.

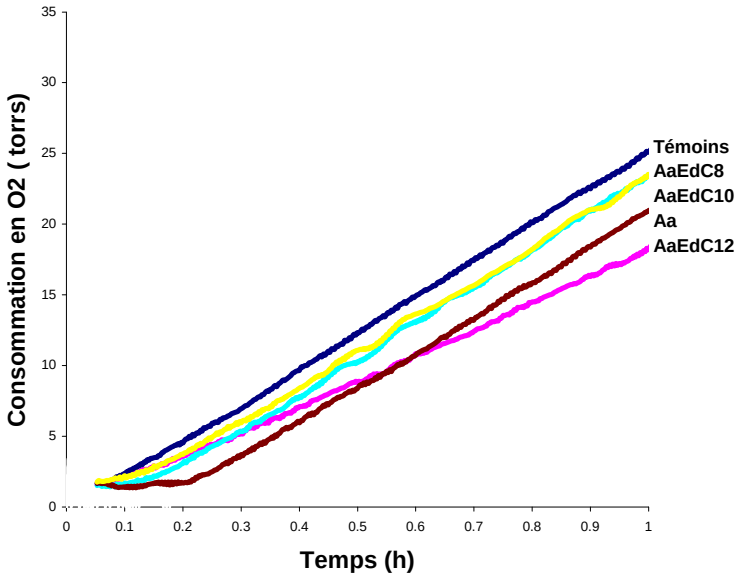


Figure 76. Evolution de l'oxydation du linoléate de méthyle en présence des composés AaEdCn à 10^{-4} M

Les temps d'inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle en présence des composés ascorbates de n-alkylammonium (AaEdCn) sont répertoriés dans le Tableau 16.

Tableau 16. Pourcentage et temps d'inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle en présence des dérivés amphiphiles de l'acide ascorbique à 10^{-4} M

Produit	*Antioxydant*	τ^a *(min)*
Acide ascorbique	Aa	12
8a	$AaEdC_8$	6
8b	$AaEdC_{10}$	7
8c	$AaEdC_{12}$	9

[a] *mesures réalisées avec le linoléate de méthyle pur comme substrat organique de référence.*

L'acide ascorbique présente un pouvoir antioxydant plus important que ces composés dérivés. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus avec les composés AaCn. Aucune corrélation évidente ne peu être tirée de ces valeurs. Cependant, les modifications des composés nouvellement formés (AaEdCn) n'influent pas de trop sur le pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique du départ.

III.3.3. ESSAIS BIOLOGIQUES IMPLIQUANT LES ASCORBATES DE N-ALKYLAMMONIUM (AACN) : TEST D'INHIBITION DE CROISSANCE

Plusieurs types d'essais ont été réalisés sur les produits AaC_n synthétisés :

- des essais d'inhibition de croissance sur milieu malt/agar à partir de disques de cellulose imprégnés par les différents produits,
- des essais d'inhibition de croissance en ajoutant directement les différents produits à tester dans le milieu malt/agar,
- des essais sur éprouvettes de bois préalablement imprégnées avec différentes formulations effectuées à partir des produits à tester.

Ces différents types d'essais permettent de rendre compte des propriétés fongicides ou fongistatiques des produits dans le cas des tests d'inhibition de croissance sur milieux gélosés, mais aussi de mettre en évidence les effets éventuels sur les mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois ainsi que les synergies potentielles avec d'autres produits.

III.3.3.1. Test d'inhibition de croissance sur disques de cellulose

La première série d'essais a été réalisée sur des disques de cellulose imprégnés avec les différents produits. Le principe consiste à imprégner des disques de cellulose avec les produits à évaluer et à observer la croissance du mycélium après avoir déposé les disques de papier sur un milieu de culture malt/agar en présence du champignon. Les disques imprégnés avec un produit inactif sur le champignon sont alors totalement recouverts, alors que ceux imprégnés avec un produit présentant une activité sur le développement du champignon ne sont pas colonisés par le mycélium.

Les essais ont été réalisés avec un champignon de pourriture blanche, *Coriolus versicolor*, fréquemment rencontrée dans la dégradation du bois. Le choix de l'utilisation d'une pourriture

blanche est lié au fait que ce type de champignon est connu pour dégrader le bois en faisant appel à différentes enzymes extracellulaires telles que les laccases et des peroxydases (Lignine Peroxyadase et Manganèse peroxydase), impliquant des réactions d'oxydation de la lignine. Ces réactions mettent en jeu différentes espèces radicalaires susceptibles d'être inhibées en présence d'antioxydants.

Les résultats des tests d'inhibition de croissance sur disque de cellulose sont rapportés dans le Tableau17.

Tableau 17. Evaluation de la croissance du mycélium sur les disques de cellulose traités avec 15 µL des différents produits testés à différentes concentrations

Produit	*Code Produit*	*Concentration (M)*							
		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}	
Acide ascorbique	Aa	+	+	+	+	+	+	+	+
4b	AaC_8	+	+	+	+	+	+	+	+
4d	AaC_{12}	+	+	+	+	+	+	+	+
4e	AaC_{16}	+	+	+	+	+	+	+	+
4f	AaC_{18}	+	+	+	+	+	+	+	+
Propiconazole	Propi	-	-	-	-	+	+	+	+

(+) indique que les champignons poussent normalement sur le papier
(-) indique que la croissance est inhibée

Les résultats obtenus indiquent qu'aucun des différents ascorbates d'ammonium testés ne possède de propriétés inhibitrices aux concentrations envisagées. Seul le propiconazole est capable d'inhiber le développement du mycélium pour des concentrations supérieures ou égales à 10^{-3} M. Suite à cette première série de mesure, nous avons envisagé une seconde série d'essais en diluant directement le produit dans le milieu de culture.

III.3.3.2. Test d'inhibition de croissance sur milieu malt/agar

Cette deuxième série de mesure a consisté à introduire directement le produit à tester dans le milieu gélosé encore tiède. Le champignon provenant d'une culture fraîchement repiquée est alors inoculé au centre de la boite de Pétri et la croissance du champignon évaluée quotidiennement. Les essais ont été réalisés sur le composé AaC_{12} retenu pour les essais de formulation ultérieurs. La Figure 77 rapporte les résultats obtenus après différents essais de dilution.

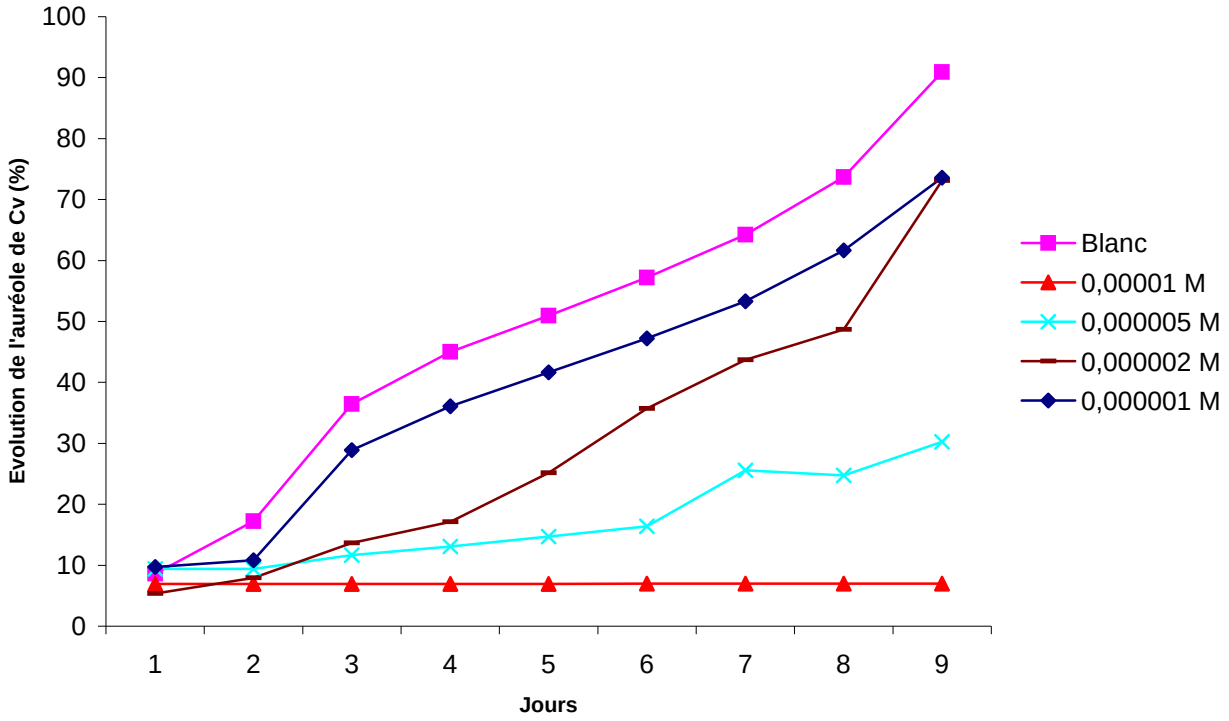


Figure 77. Effet du composé AaC_{12} sur la croissance de *Coriolus versicolor*

Contrairement aux essais réalisés sur disques de papier, le produit AaC_{12} présente une activité inhibitrice sur la croissance du mycélium. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est comprise entre 10^{-5} et 5.10^{-6} M. La conclusion tirée de ces essais quant à l'activité fongicide du composé AaC_{12} est très différente de celle tirée de la première série d'essais. L'explication la plus probable est que les gammes de concentrations utilisées lors des essais sur papier soient justes en dessous des concentrations requises pour observer une activité.

Le propiconazole testé dans des conditions similaires conduit aux résultats rapportés dans la Figure 78.

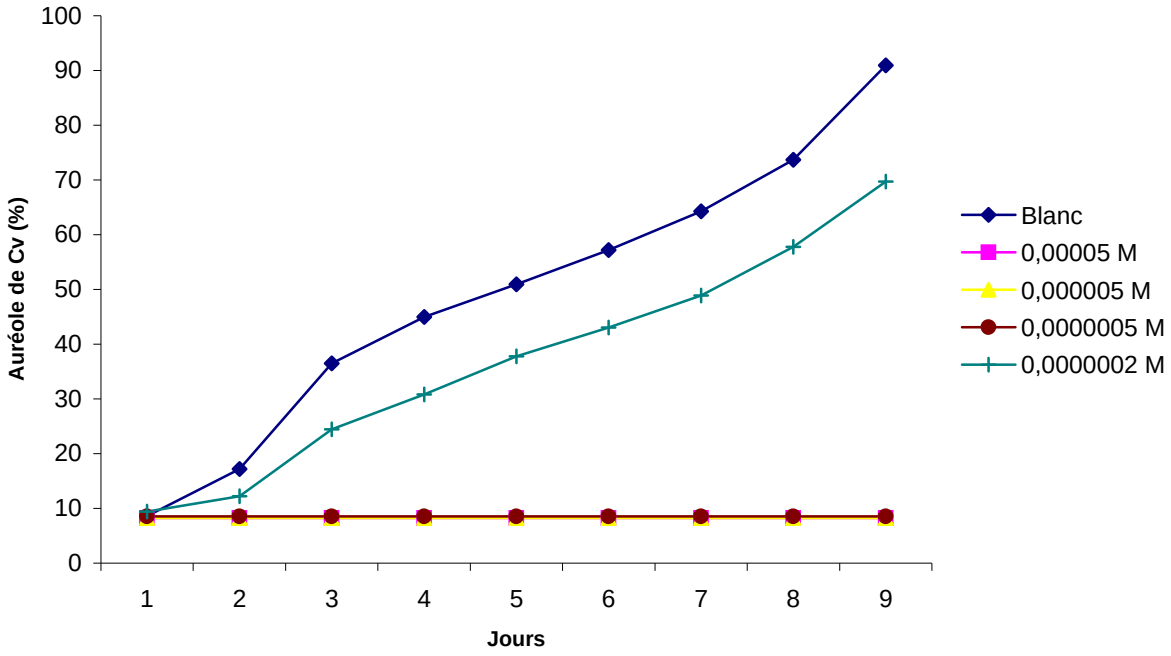


Figure 78. Effet du propiconazole sur la croissance de *Coriolus versicolor*

Comparativement à la concentration minimale inhibitrice (CMI) déterminée avec les essais réalisés sur papier filtre, la CMI déterminée suite aux tests effectués en incorporant le biocide dans le milieu de culture est beaucoup plus faible. On observe pratiquement un facteur 1000 entre les valeurs déterminées avec les deux essais, qui peut probablement expliquer la différence d'activité mesurée pour le composé AaC_{12}.

Etant donné la CMI du propiconazole comprise entre 2.10^{-7} et 5.10^{-7} M, on peut conclure que l'ascorbate de dodécylammonium possède en plus de ses propriétés surfactantes, des propriétés fongicides intéressantes. De façon à mieux cerner l'origine de ces propriétés, nous avons entrepris de réaliser une étude structure/activité en faisant varier différents paramètres dans la structure du composé AaC_{12}.

a) Effet de la structure des sels d'ascorbates sur les propriétés biologiques

L'effet de différents sels ainsi que des différents produits intervenant dans la composition de ces derniers a été envisagé pour mettre en évidence le rôle de la structure sur les propriétés biologiques du composé. Nous avons ainsi évalué l'effet des produits décrits ci dessous sur la croissance de *Coriolus versicolor*.

- l'acide ascorbique
- l'ascorbate de butylammonium

- la butylamine
- l'acétate de dodecylammonium
- l'acide acétique
- la dodécylamine
- le chlorure de dodecylammonium
- l'acide D-glucuronique
- le D-glucuronate de dodecylammonium

Enfin de façon à mieux cerner les potentialités du composé étudié, nous avons comparé son activité avec celle du chlorure de didécyldimethylammonium (DDAC) utilisé comme fongicides dans le domaine de la préservation du bois.

b) Effet de chaque constituants du sel d'AaC$_{12}$ pris séparément

L'effet de l'acide ascorbique sur la croissance de *Coriolus versicolor* est rapporté dans le Figure 79.

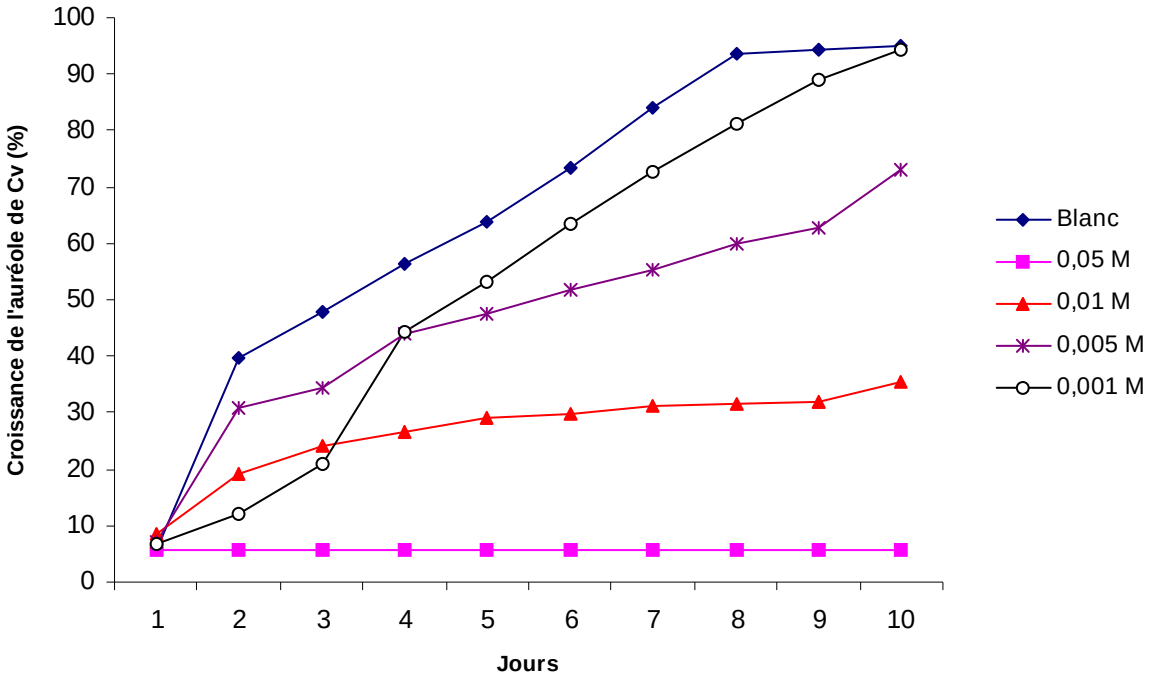


Figure 79. Effet de l'acide ascorbique sur la croissance de *Coriolus versicolor*

L'acide ascorbique présente un pouvoir inhibiteur lorsqu'il est utilisé à fortes concentrations comprises entre 5.10^{-2} et 10^{-2}M. En dessous de ces concentrations, l'acide ascorbique a peu d'effets sur l'inhibition de la croissance du champignon.

La dodécylamine a également été testée séparément soit sous forme d'amine libre ou de chlorhydrate d'ammonium (Figure 80).

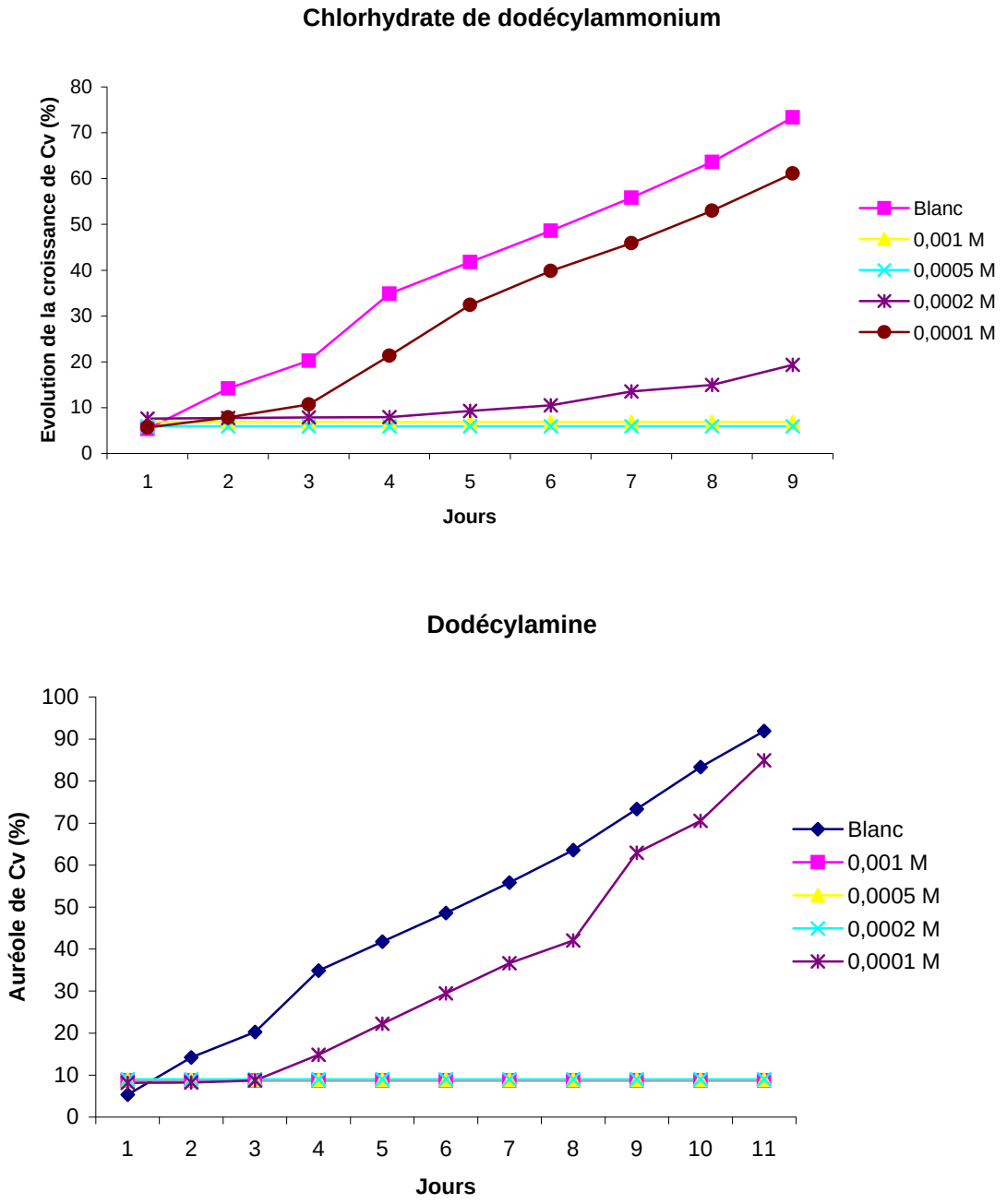


Figure 80. Effet de la dodécylamine et de son chlorhydrate sur la croissance de *Coriolus versicolor*

L'action de la dodécylamine est pratiquement similaire à celle de son chlorhydrate. Cela s'explique facilement à partir du pH du milieu de culture utilisé pour les essais. En effet, après avoir solubilisé le malt et l'agar le pH du milieu est ajusté à 5 expliquant le comportement assez similaire des deux produits testés. La CMI se situe entre 2.10^{-4} et 10^{-4} M conférant au chlorure de dodecylammonium une légère activité antifongique.

c) Effet du contre ion associé à l'ammonium de dodécylamine

Afin de tester l'importance de la partie ascorbate, nous avons évalué les propriétés de l'acétate de dodécylammonium présentant un contre ion faiblement polaire et du D-glucuronate de dodecylammonium présentant un contre ion osidique très hydrophile de la même nature que celui obtenu avec l'acide ascorbique. Les résultats sont présentés dans les Figures 81 et 82.

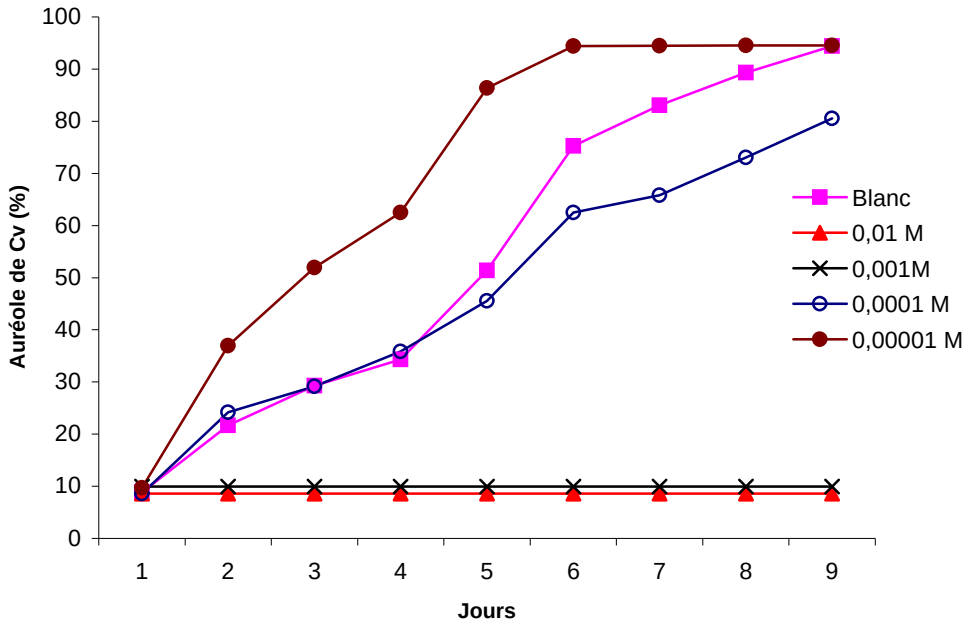


Figure 81. Effet de l'acétate de dodécylammonium sur la croissance de *Coriolus versicolor*

L'acétate de dodécylammonium possède un effet inhibiteur sur la croissance de *Coriolus versicolor* aux fortes concentrations (10^{-3} M). En dessous de ces concentrations, les effets sont peu marqués. Dans tous les cas, l'activité de l'acétate de dodécylammonium est moins importante que celle de l'ascorbate correspondant.

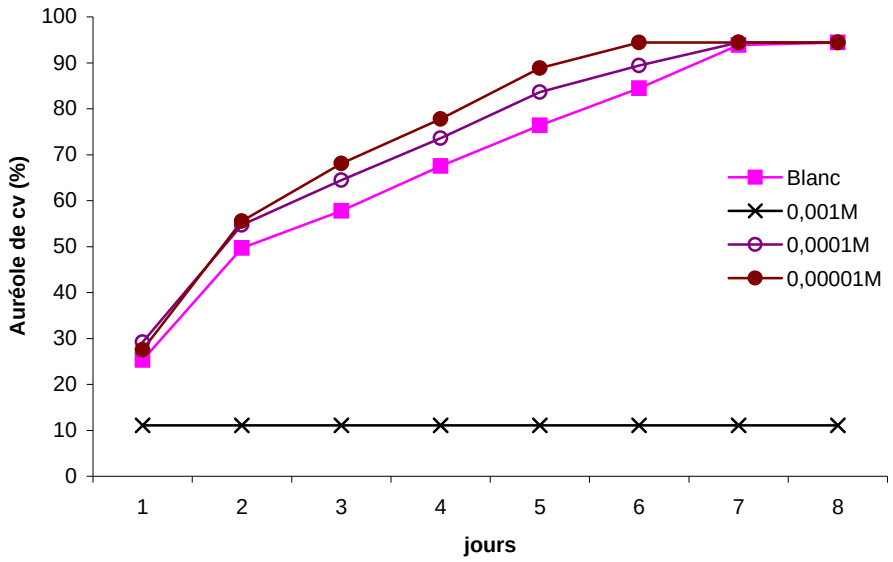


Figure 82. Effet du D-glucuronate de dodécylammonium sur la croissance de *Coriolus versicolor*

Les résultats obtenus avec le D-glucuronate de dodécylammonium sont similaires à ceux obtenus avec l'acétate. L'effet antifongique observé est à nouveau moins important que celui observé pour l'ascorbate.

Parallèlement à ces essais, l'effet de l'acide acétique et de l'acide glucuronique a été évalué jusqu'à des concentrations de 10^{-2} M. Aucun de ces produits ne présente un effet inhibiteur sur la croissance de *Coriolus versicolor*.

d) Effet de la longueur de la chaîne alkyle

Tous les sels de dodécylammonium testés présentent un effet inhibiteur sur la croissance du champignon. Ces résultats nous poussent à penser que les propriétés tensioactives des produits testés jouent un rôle important sur l'activité biologique des produits. En effet, les tensioactifs comme les ammonium quaternaires sont connus pour interagir avec les parois cellulaires (Donnell et Russel, 1999 ; Carmona *et al*., 2006). D'une façon similaire, les produits testés seraient capables d'interagir plus ou moins efficacement avec les parois cellulaires fongiques conduisant à la rupture de ces dernières provoquant la mort du champignon.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons envisagé d'étudier l'activité de l'ascorbate de butylammonium ne présentant pas de propriétés tensioactives. Les résultats obtenus sont rapportés dans la Figure 83.

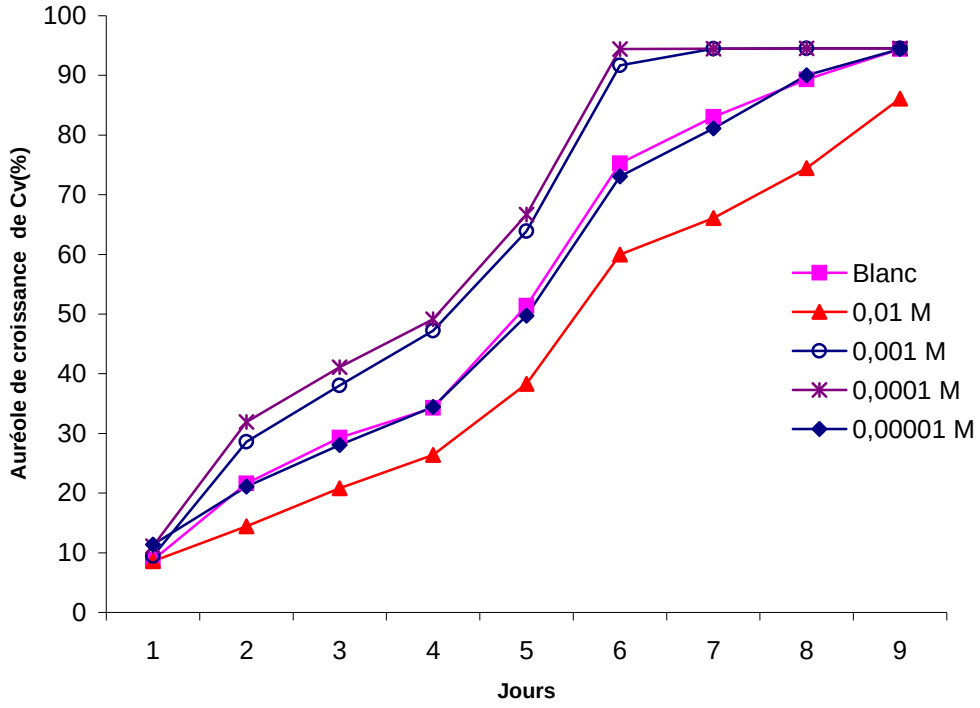


Figure 83. Effet de l'ascorbate de butylammonium sur la croissance de *Coriolus versicolor*

Aucune des concentrations testées n'est capable d'inhiber la croissance du mycélium. Ces résultats montrent sans ambiguïté, que les propriétés tensioactives des produits testés précédemment jouent un rôle primordial dans l'activité biologique des produits. L'ascorbate de butylammonium, dépourvu de propriétés tensioactives, ne présente pour sa part aucune activité.

Pour fixer plus précisément l'activité de nos produits, nous avons évalué dans les mêmes conditions les propriétés du chlorure de didecyldiméthylammonium (DDAC) utilisé industriellement pour la préservation du bois.

De façon similaire, le chlorhydrate de butylammonium ne possède aucun effet sur la croissance du mycélium à des concentrations inférieures à 10^{-2} M confirmant l'importance des propriétés tensioactives par rapport au chlorhydrate de dodecylammonium.

e) Comparaison avec le DDAC

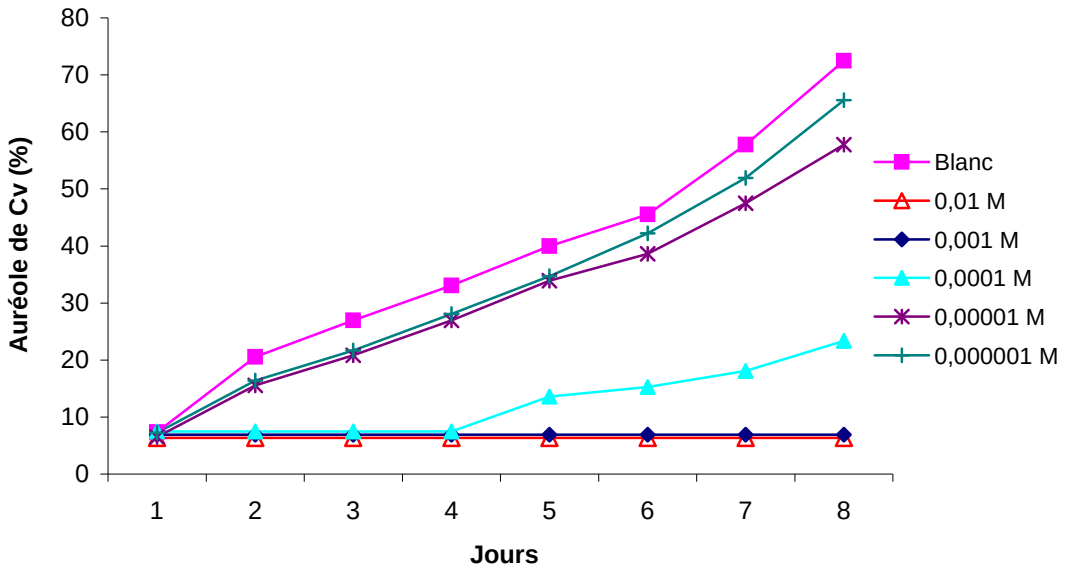


Figure 84. Effet du chlorure de didecyldiméthylammonium sur la croissance de *Coriolus versicolor*

La CMI du chlorure de didecyldiméthylammonium se situe aux alentours de 10^{-4} M, ce qui la place entre celle de l'ascorbate et des autres produits testés. Afin de faciliter les comparaisons, la Figure 85 rassemble les résultats obtenus après dix jours pour les principaux produits étudiés.

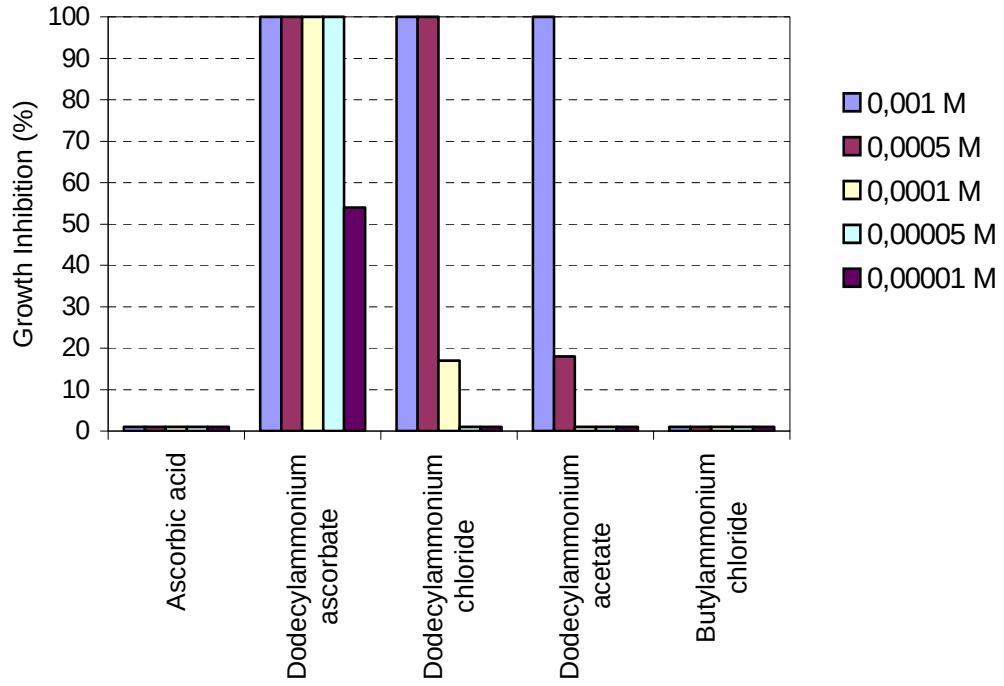


Figure 85. Effet des différents produits sur la croissance du mycélium

Il est clair qu'à partir de ces résultats, les propriétés tensioactives des sels d'ascorbate d'amines grasses leur permettent d'inhiber la croissance du mycélium. L'inhibition de croissance mesurée pour le composé AaC_{12} est importante, alors que les composés présentant une chaîne alkyle en C_4 comme l'ascorbate AaC_4 ou le chlorure de butylammonium ne présentent aucune activité. Le remplacement du motif ascorbate par un autre contre ion tel qu'un chlorure ou un acétate nécessite l'utilisation de concentrations plus importantes pour atteindre la CMI. Le rôle de la partie antioxydante reste toutefois mal compris et nécessiterait des investigations complémentaires. Il semble que les propriétés amphiphiles soient primordiales et expliquent l'activité biologique observée pour le composé AaC_{12}. De plus, les tensioactifs cationiques sont rapportés pour permettre le transport de drogues, de gènes ou d'antigènes au travers des membranes biologiques et peuvent dans certains cas présenter des effets de synergie avec les produits transportés (Avigliano et Finazzi-Agro, 1997 ; Carmona *et al.*, 2006). L'activité importante du composé AaC_{12} comparativement au DDAC lui confère des propriétés attrayantes et des potentialités intéressantes pour la préservation du bois. Le composé AaC_{12} apparaît donc comme un produit intéressant pour la formulation de produits de préservation.

III.3.3.3. APPLICATION DE L'ASCORBATE DE DODECYLAMMONIUM A LA FORMULATION DE PRODUITS DE PRESERVATION DU BOIS

De façon à nous placer dans des conditions proches de la réalité industrielle, nous avons utilisé des quantités de produit similaires à celles utilisées dans la pratique. Pour cela, nous nous sommes basé sur une formulation de référence dont la composition nous a été généreusement fournie par la société Dyrup (Albi, France). Cette formulation se présente sous la forme d'un concentré hydrodispersable contenant 10 % de propiconazole, 17 % d'éther monométhylique de dipropylèneglycol (Dowanol DPM) comme co-solvant et 10 % de tensioactif à base ricinoléate de glycérine éthoxylée (Simulsol 5815 S). En nous basant sur cette composition, nous avons préparé dans un premier temps deux formulations utilisant soit l'ascorbate de dodécylammonium (AaC_{12}**)** préparé précédemment, soit Empilan NP 12 appartenant à la famille des nonylphénolpolyéthoxylés. Pour des raisons de solubilité du composé AaC_{12}, les solutions mères ont été préparées en associant 1 % de propiconazole, 1,5 % de Dowanol DPM et 1,7 % de tensioactif. La composition de chacune de ces solutions est donnée ci-dessous :

- Formulation 5 : Propiconazole (1 %)/Dowanol DPM (1,5 %)/Empilan NP 12 (1,7 %) dans l'eau,
- Formulation 6 : Propiconazole (1 %)/Dowanol DPM (1,5 %)/AaC_{12} (1,7 %) dans l'eau.

Ces solutions, diluées aux 1/10, 1/50, 1/100 et 1/1000, ont été imprégnées dans les éprouvettes de hêtre et ces dernières confrontées à *Coriolus versicolor* pendant 16 semaines. Parallèlement à ces microémulsions, des solutions témoins ont été préparées avec chacun des composants utilisés. Les résultats obtenus sont rapportés dans la Figure 86.

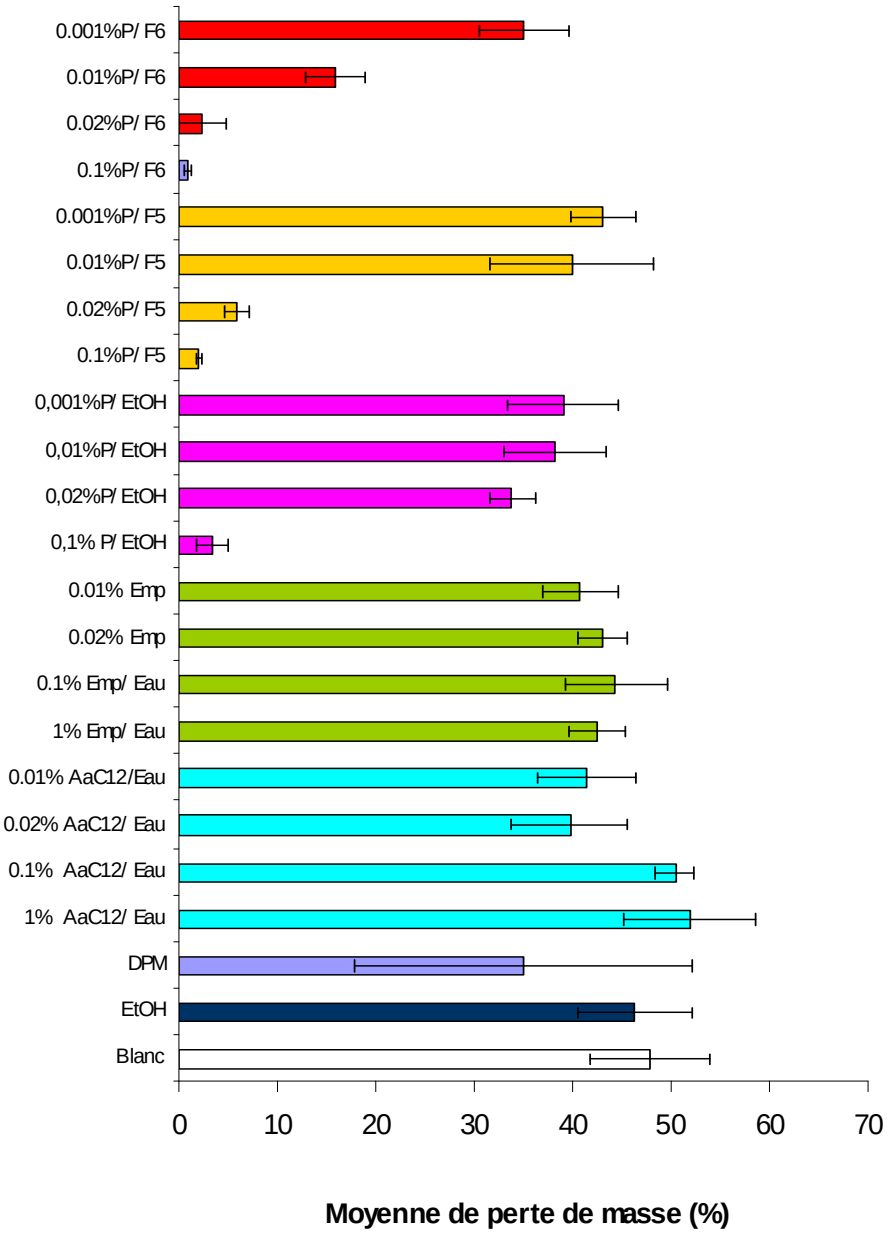


Figure 86. Pertes de masse des éprouvettes de hêtre traitées avec différentes formulations après 16 semaines d'exposition à *Coriolus versicolor* (Formulation 5 à base d'Empilan NP 12, Formulation 6 à base de AaC_{12})

Les résultats obtenus montrent que pour une concentration donnée en propiconazole, les formulations aqueuses sont plus performantes que la solution dans l'éthanol. En effet, le propiconazole est capable de protéger les éprouvettes de bois lorsqu'il est utilisé à 0,1 % et ceci quelque soit la nature de la solution d'imprégnation (microémulsion dans l'eau ou solution alcoolique), alors qu'utilisé à une concentration plus faible de 0,02 %, seules les microémulsions présentent une activité significative. Au-delà de cette concentration, l'efficacité des microémulsions diminue au fur et à mesure que la concentration diminue. Cette différence de comportement peut probablement s'expliquer par la différence de polarité des solvants utilisés et leurs effets sur le gonflement du bois permettant de faire diffuser plus efficacement le biocide dans le bois et particulièrement dans les parois cellulaires. La Formulation 6 mettant en œuvre le tensioactif antioxydant conduit à des résultats légèrement meilleurs que ceux obtenus avec le tensioactif classique. Aux dilutions utilisées, l'Empilan NP 12, l'ascorbate de dodécylammonium et le co-solvant ne présentent aucun effet sur l'inhibition de la dégradation du bois et conduisent à des pertes de masses similaires à celles observées pour les éprouvettes témoins.

Pour vérifier la reproductibilité des résultats obtenus, les expériences précédentes ont été répétées dans des conditions quasiment similaires en utilisant un tensioactif à base de ricinoléate de glycérine éthoxylée, le Simulsol 5815 S. Ce dernier présente l'avantage d'être moins toxique que les tensioactifs de la famille des alkylphénol éthoxylés.

La composition de chacune des solutions testées est donnée ci-dessous :

- Formulation 3 : Propiconazole (1 %)/Dowanol DPM (1,5 %)/Simulsol 5815 S (1,7 %) dans l'eau,

- Formulation 6 : Propiconazole (1 %)/Dowanol DPM (1,5 %)/**AaC_{12}** (1,7 %) dans l'eau comme précédemment.

Les résultats sont rapportés dans la Figure 87.

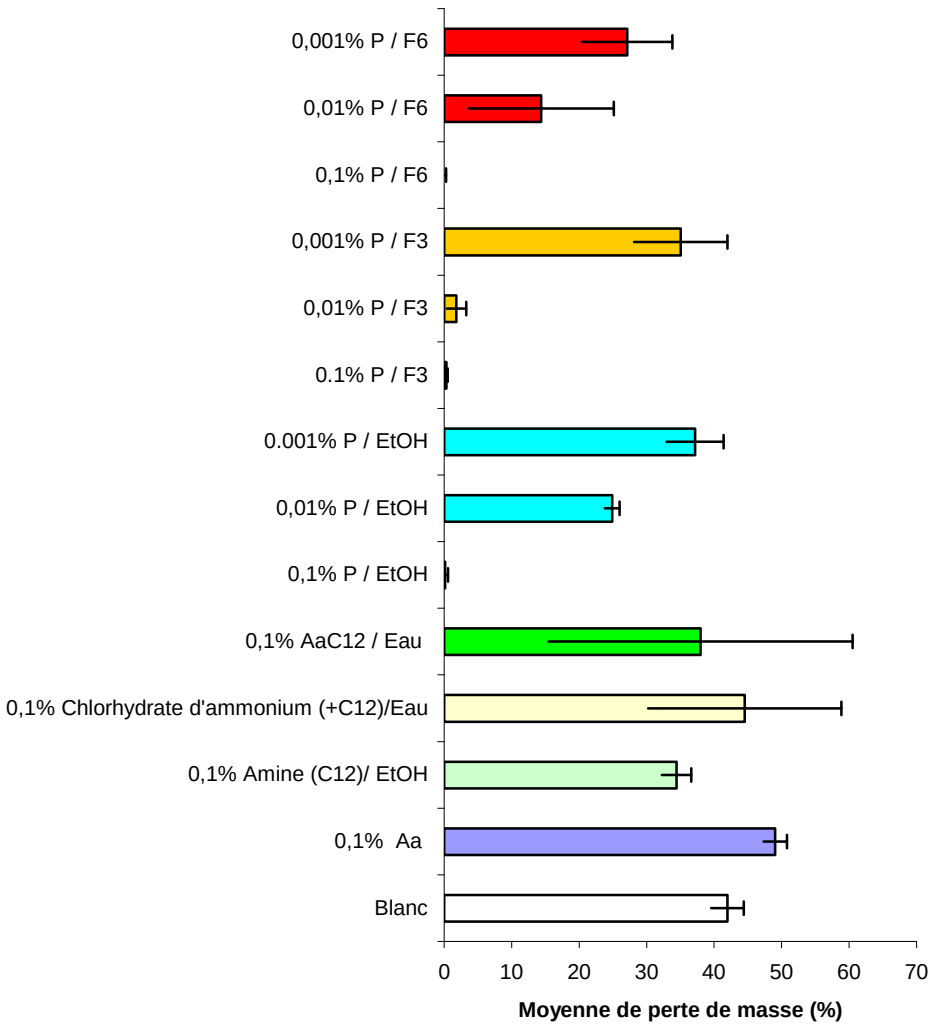


Figure 87. Pertes de masse des éprouvettes de hêtre traitées avec différentes formulations après 16 semaines d'exposition à *Coriolus versicolor* (F_6 = Formulation 6 à base de AaC_{12}, F_3 = Formulation 3 à base de Simulsol 5815 S)

Les résultats obtenus avec le composé AaC_{12} sont assez similaires à ceux obtenus dans la première série d'essais, bien que le seuil d'efficacité soit légèrement inférieur (0,1 % comparativement à 0,02 %). L'utilisation du Simulsol 5815 S semble conduire à des résultats sensiblement meilleurs que ceux obtenus avec les deux autres tensioactifs. Les émulsions présentent à nouveau une efficacité plus importante par rapport à l'utilisation de propiconazole solubilisé dans l'éthanol. L'effet des propriétés antioxydantes associées aux propriétés tensioactives semble moins évident que dans la première série d'essais.

D'autres essais ont été réalisés avec le composé AaC_{12} utilisé à une concentration de 3,62 % sans co-solvant en présence de 1 % de propiconazole (Formulation 7). Cette concentration correspond à la concentration maximale d'AaC_{12} soluble dans l'eau. Au-delà de cette valeur, la solution devient trouble et le tensioactif devient partiellement soluble. Les résultats sont rapportés dans la Figure 88.

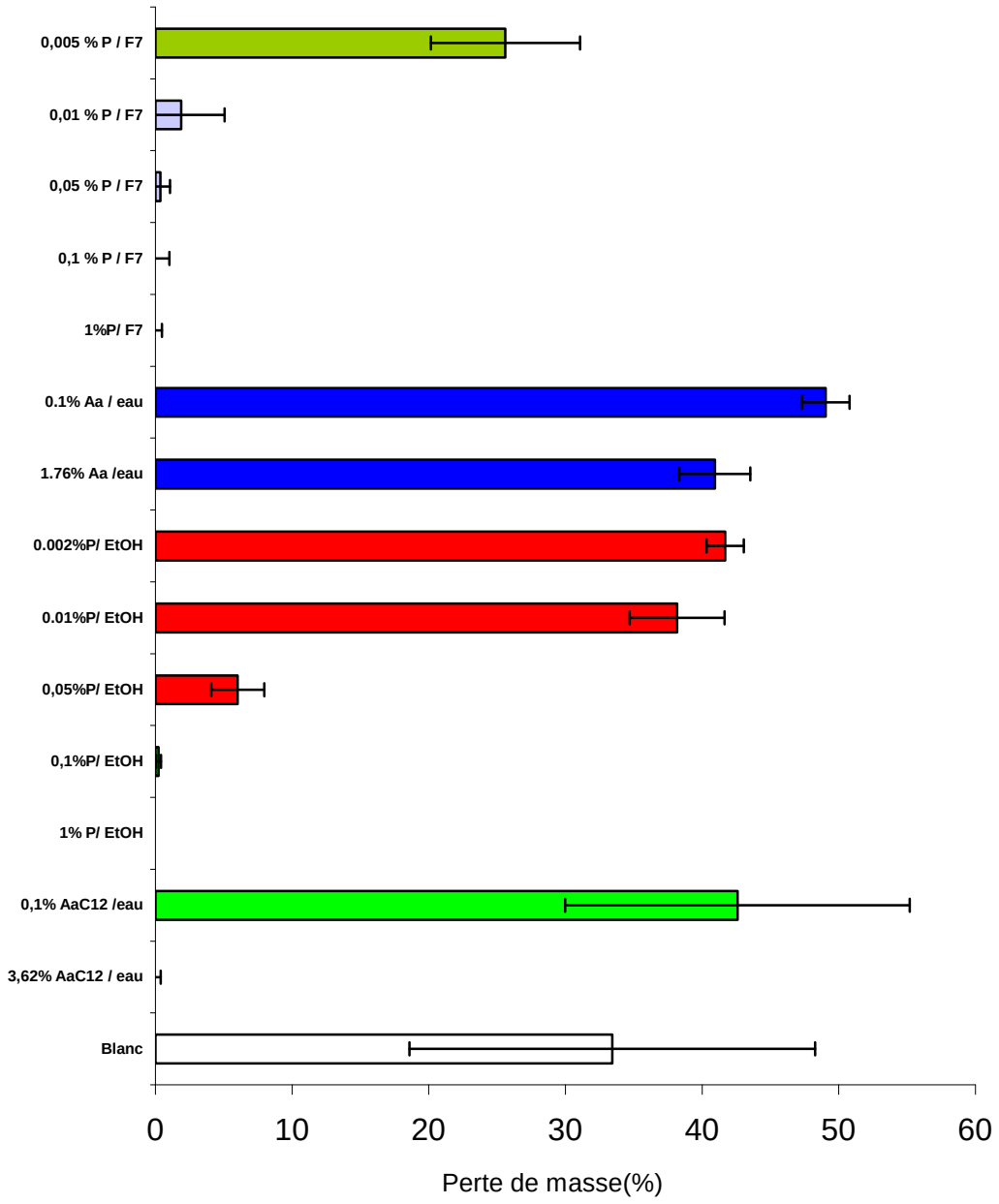


Figure 88. Pertes de masse des éprouvettes de hêtre traitées avec différentes formulations après 16 semaines d'exposition à *Coriolus versicolor* (F_7 = Formulation 7 à base de l'AaC_{12} seul)

Utilisé à plus forte concentration, l'ascorbate de dodécylammonium est capable d'inhiber la dégradation du bois par *Coriolus versicolor*. En effet, aucune perte de masse n'est observée après 16 semaines d'incubation pour des éprouvettes traitées avec une solution contenant 3,6 % d'AaC_{12}. A plus faible concentration (0,1 %), l'ascorbate d'ammonium n'est pas capable d'inhiber la dégradation du bois.

Le propiconazole formulé avec le composé AaC_{12}, à plus forte concentration, est actif à plus faible concentration, que dans les essais précédents. Réalisés avec le même tensioactif, ces essais peuvent indiquer un effet de synergie dû aux propriétés antioxydantes plus marquées. Il reste toutefois nécessaire de considérer ces résultats avec prudence du fait des faibles différences de concentrations relevées entre les différents tensioactifs testés.

Pour vérifier l'origine de l'activité du composé AaC_{12} aux fortes concentrations, nous avons évalué l'effet de chaque constituant du sel sur la croissance de *Coriolus versicolor*. Les résultats sont rapportés dans la Figure 89.

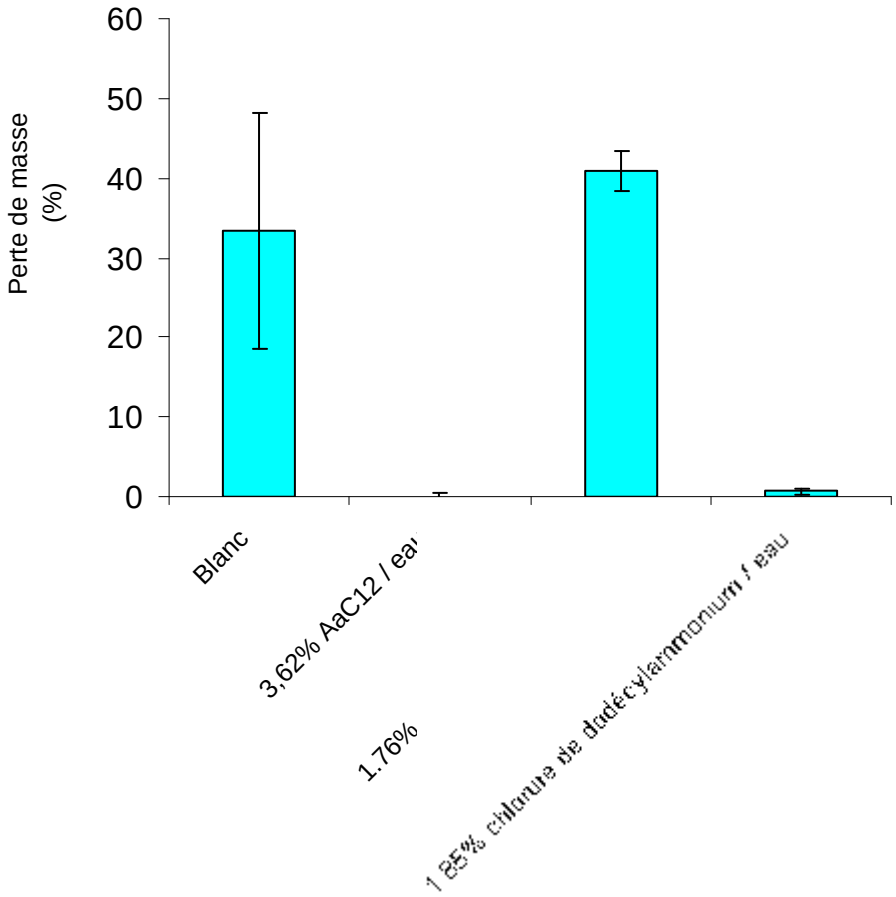


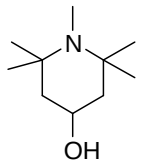
Figure 89. Pertes de masse des éprouvettes de hêtre traitées avec le sel d'AaC_{12} à forte concentration et effet de chacun des contre ions du sel

Les résultats obtenus indiquent clairement que les propriétés tensioactives sont primordiales pour l'activité biologique du produit. L'ascorbate de dodécylammonium, tout comme le chlorure de dodécylammonium inhibent totalement la dégradation du bois par le champignon. La partie antioxydante associée à l'acide ascorbique a pour sa part aucun effet sur la protection du bois.

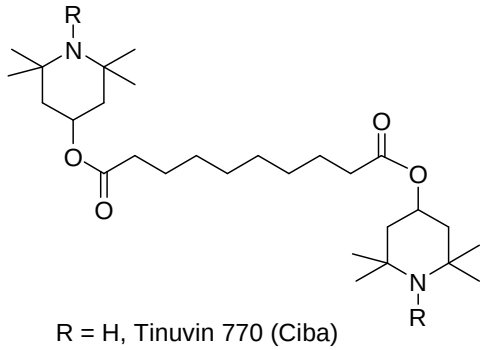
III.4. SYNTHESE ET EVALUATION DE NOUVEAUX TENSIOACTIFS INCLUANT UN MOTIF AMINE ENCOMBREE

III.4.1. SYNTHESE

Parmi les produits de départ à notre disposition pour introduire un motif amine encombrée, nous avons choisi d'utiliser le 1, 2, 2, 6, 6-pentaméthylpipéridin-4-ol. Ce motif est abondamment utilisé dans différents antioxydants liposolubles d'origine industrielle trouvant des applications comme additifs dans la stabilisation des polymères.



1, 2, 2, 6, 6-pentaméthylpipéridin-4-ol



R = H, Tinuvin 770 (Ciba)
R = CH_3, Tinuvin 765 (Ciba)

Figure 90. Exemples d'antioxydants présentant un motif amine encombrée

De façon à mettre au point une synthèse relativement facile à mettre en œuvre, nous avons choisi d'utiliser le produit de condensation du pentaméthylpypéridinol sur l'anhydride succinique comme contre ion d'un ammonium quaternaire à chaîne grasse apportant les propriétés tensioactives en conférant à la fois la solubilité dans l'eau par la partie ammonium et dans les solvants organiques par la partie carbonée (Figure 91). Cette approche est en tous points similaire à celle qui à été développée précédemment avec l'ascorbate comme contre ion à propriétés antioxydantes à la différence que les amines encombrées, contrairement à l'acide ascorbique qui est consommé au cours de la réaction, présentent un mode d'action différent sur l'inhibition des réactions d'oxydation. En

effet, ces dernières sont rapportées pour agir de façon catalytique, ce qui pourrait constituer un avantage considérable de leur utilisation dans des systèmes où la protection est sensée durer pendant des périodes relativement longues.

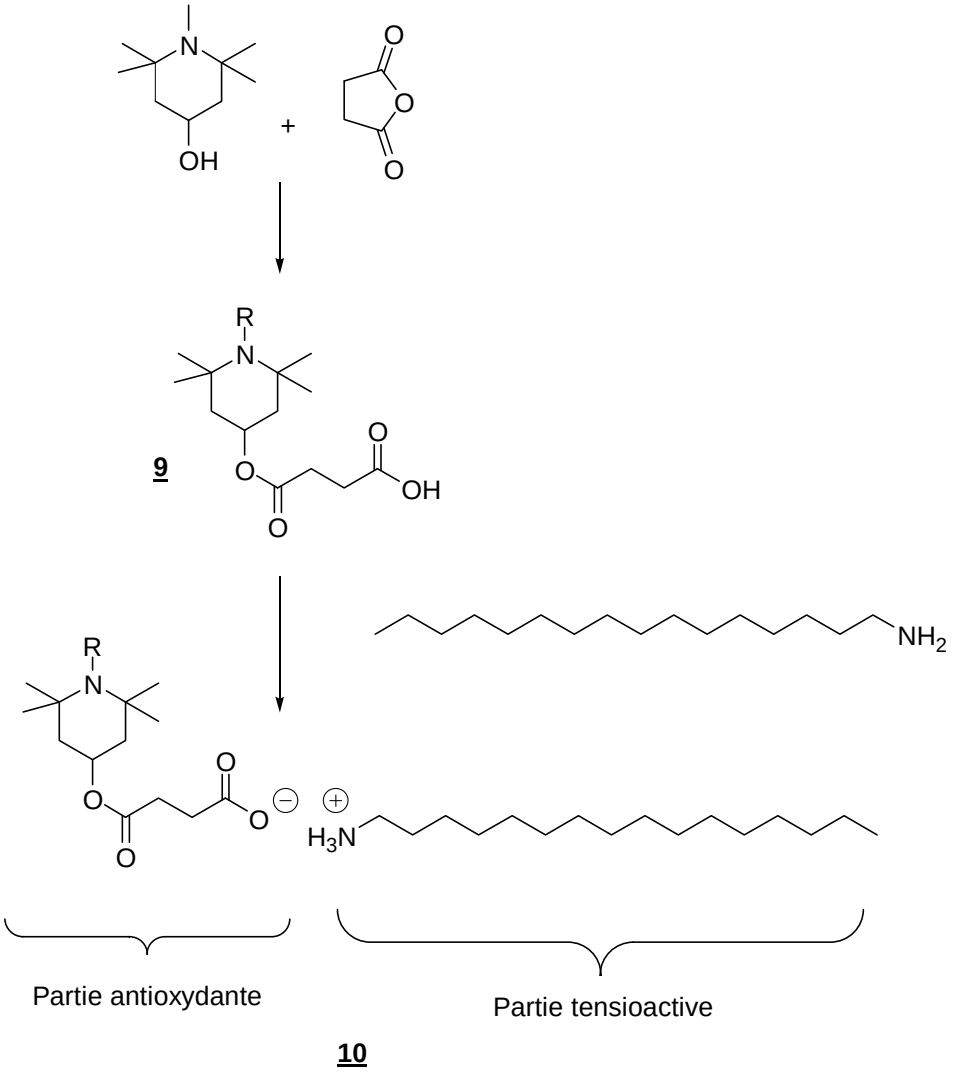


Figure 91. Préparation des composés amphiphiles possédant un motif antioxydant de type amine encombrée

Le composé **9** est obtenu facilement en faisant réagir le 1, 2, 2, 6, 6-pentaméthylpipéridin-4-ol avec l'anhydride succinique en présence de pyridine. Différents essais réalisés avec des quantités variables de pyridine ou sans ont permis de mettre en évidence que les meilleures conditions consistaient à utiliser un excès de 10 équivalents de pyridine dans le toluène permettant une purification plus simple du produit en fin de réaction. Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc après évaporation du solvant et de la pyridine. Aucun, traitement acide n'est nécessaire en fin

de réaction laissant penser que le produit solide obtenu se présente sous forme zwittérionique. L'analyse RMN ^{1}H du produit obtenu semble indiquer que le composé **9** existe en solution principalement sous forme acide et non zwittérionique comme cela semblait le cas du fait de la non nécessité d'une étape de reprotonation lors de son obtention. Même si la présence d'une forme zwittérionique n'est peut pas être totalement exclue, l'encombrement de la fonction amine tertiaire pourrait être à l'origine de ce comportement et expliquer le déplacement de l'équilibre vers la forme protonnée au niveau de la fonction acide carboxylique (Figure 92).

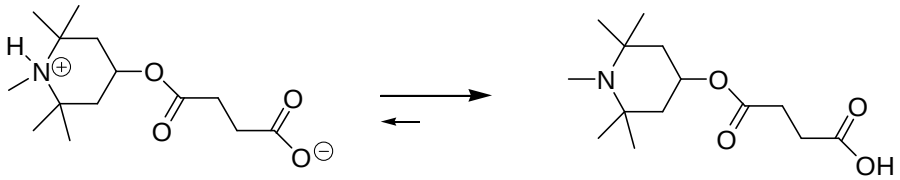
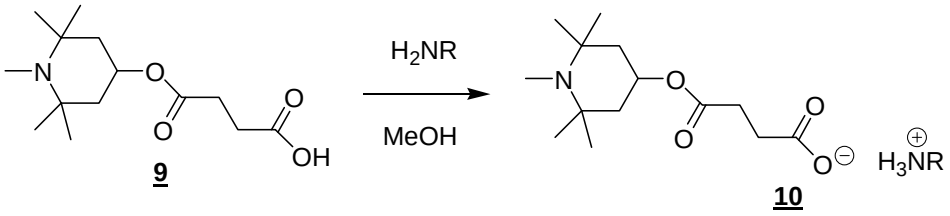


Figure 92. Différentes formes possibles pour le composé **9**

Le composé **9** a été ensuite mis en contact avec une amine grasse dans du méthanol durant 4 heures à température ambiante. Les produits **10** obtenus sont isolés différemment suivant la longueur de la chaîne aminocarbonée utilisée. Le composé **10a** ayant une chaîne aminocarbonée égale à 8 atomes de carbone est obtenu directement après évaporation du solvant sous pression réduite, alors que les composés **10b**, **10c** et **10d**, possédant des chaînes aminocarbonées plus longues, précipitent. Dans ce cas, les sels sont isolés par filtration sous vide et le résidu est rincé avec un peu d'éther.

Les produits obtenus sont identifiés avec le code PiCn, où n correspondant au nombre d'atomes de carbone contenu par la chaîne aminocarbonée. Le Tableau 18 rapporte les différents produits synthétisés et quelques-unes une de leurs caractéristiques.

Tableau 18. Formation des sels d'ammonium PiCn



Produit	*R*	*Code Produit*	*Rendement (%)*	*Aspect du produit*	*PF (°C)*
10a	*n*-C_8H_{17}-	PiC_8	98	Solide jaune	65
10b	*n*-$C_{12}H_{25}$-	PiC_{12}	97	Solide blanc	66
10c	*n*-$C_{16}H_{33}$-	PiC_{16}	93	Solide blanc	67
10d	*n*-$C_{18}H_{37}$-	PiC_{18}	90	Solide blanc	67,5

Les produits se présentent sous forme de solides plus ou moins colorés et les rendements sont pratiquement quantitatifs. Les produits sont purifiés lavages avec différents solvant en fonction la longueur de la chaîne alkyle utilisée.

III.4.2. PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES

III.4.2.1. Comportement dans l'eau : propriétés de surface

La solubilité de ces sels dans l'eau dépend directement de la longueur de la chaîne carbonée associée, elle se trouve aux alentours de 1,5 moles par litre pour l'ensemble de composés synthétisés. Cependant, plus la chaîne aminocarbonée associée est longue, moins le composé est soluble. Nous avons également pour ces composés établis les courbes de tension superficielle en fonction de la concentration (Figure 93).

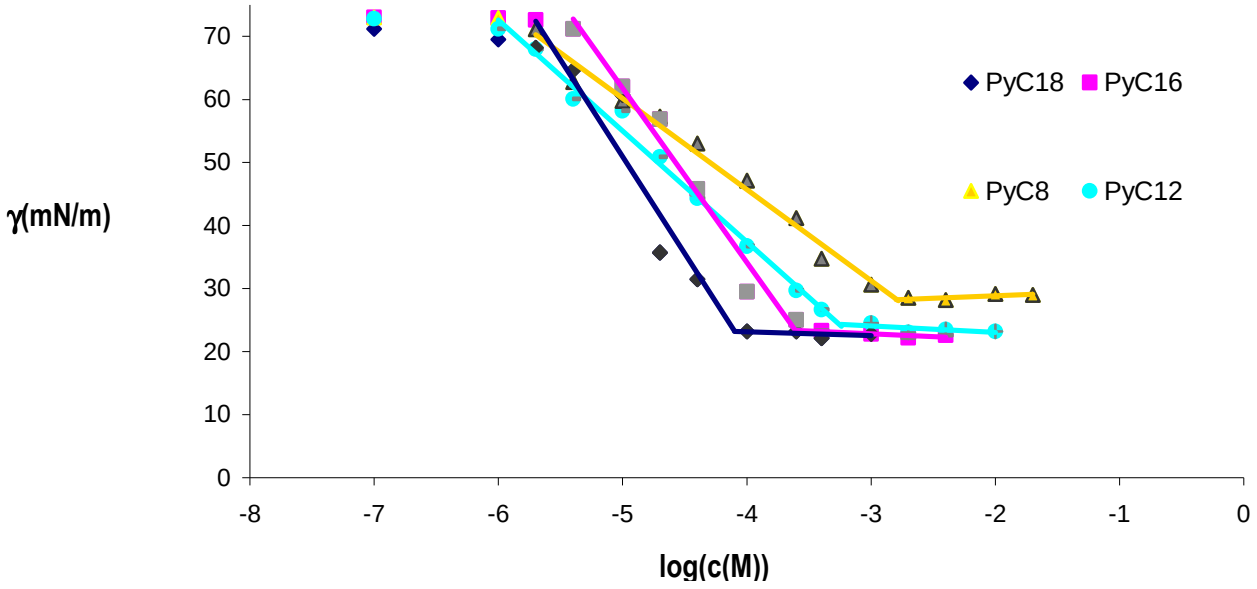


Figure 93. Détermination de la CAC des composés PiCn

Les composés synthétisés ont un comportement de tensioactifs hydrogénés classiques et leur concentration agrégative critique évolue suivant la longueur de la chaîne carbonée. L'évolution la Concentration Agrégative Critique des différents composés en fonction de la longueur de la chaîne carbonée est rapportée dans la Figure 94.

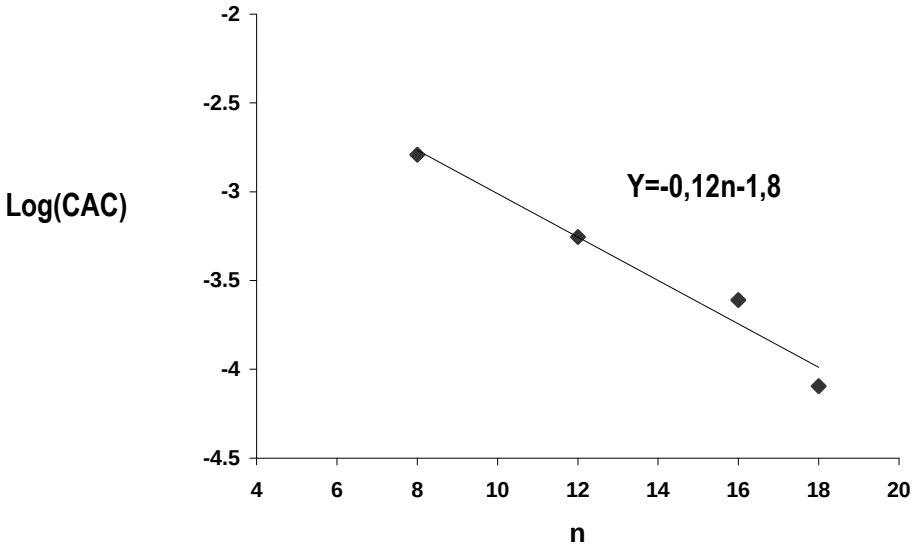


Figure 94. Evolution de CAC en fonction de la longueur de la chaîne aminocarbonée

L'évolution de la CAC en fonction de la longueur de la chaîne carbonée des PiCn respecte la solubilité des composés en milieu aqueux, plus la chaîne carbonée est grande, plus le composé est hydrophobe et donc s'organise plus rapidement en agrégat en solution suivant un ordre prédictible.

Tableau 19. Tension superficielle et concentration agrégative critique des composés **10**

Produit	*Code Produit*	*γcac (mN/m)*	*CAC (mol/L)*	Γ (mol/cm^2)	σ (Å^2/molécule)
10a	PiC_8	28	$1,61.10^{-3}$	$1,27.10^{-6}$	131,3
10b	PiC_{12}	24,5	$5,54.10^{-4}$	$1,54.10^{-6}$	107,81
10c	PiC_{16}	23,5	$2,45.10^{-4}$	$2,42.10^{-6}$	68,66
10d	PiC_{18}	23	$8,03.10^{-5}$	$2,69.10^{-6}$	61,78

Les valeurs de γ obtenues indiquent toutes des abaissements par rapport à la tension superficielle de l'eau (γH_2O = 72 mN/m) jusqu'aux alentours de 23 mN/m pour les composés cationiques PiC_{16-18}, de 24 mN/m pour le PiC_{12} et de 28 mN/m pour le PiC_8. Les composés PiCn synthétisés ont donc des comportements de tensioactifs classiques. Les surfaces par têtes polaires évoluent suivant des tendances similaires à celles rapportées dans la littérature pour des tensioactifs cationiques classiques.

III.4.2.2. Propriétés antioxydantes

L'étude des propriétés antioxydantes a été réalisée en utilisant la méthode impliquant l'inhibition de l'oxydation du linoléate de méthyle. Dans un premier temps, le 1, 2, 2, 6, 6-pentaméthyl-4-pipéridinol a été utilisé pour la rechercher les concentrations optimales d'expérimentation. La Figure 95 rapporte les principaux résultats obtenus.

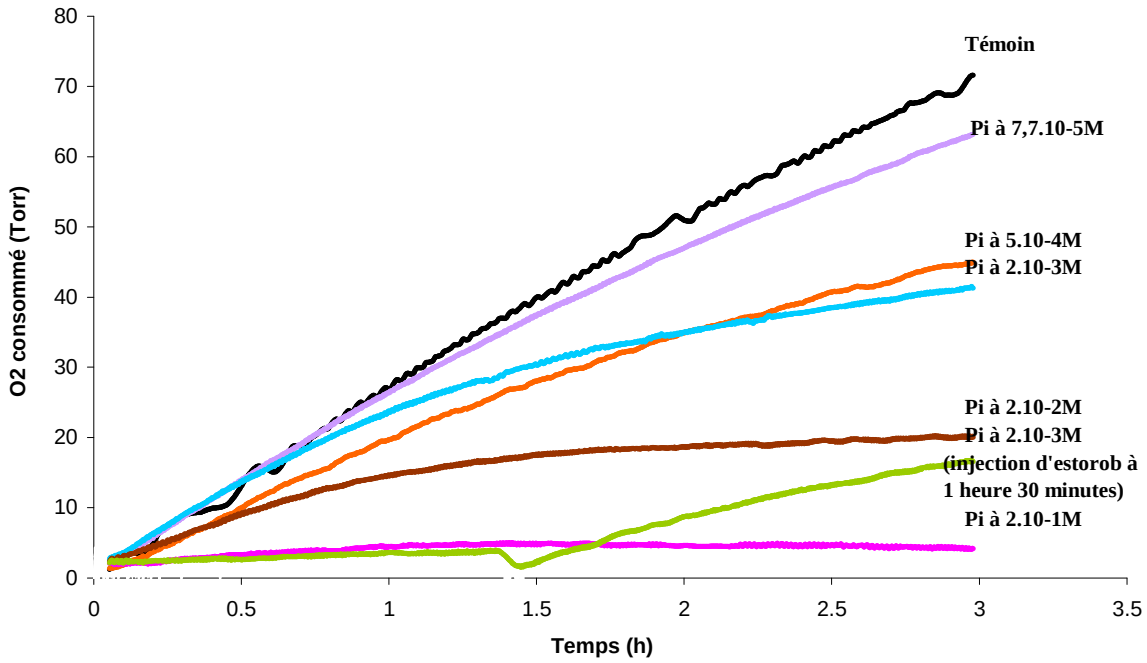


Figure 95. Effet de différentes concentrations de 1, 2, 2, 6, 6-pentaméthyl-4-pipéridinol sur la consommation d'oxygène lors de l'oxydation du linoléate de méthyle en présence d'AIBN

L'allure des courbes réalisées en présence de différentes concentrations de 1, 2, 2, 6, 6-pentaméthyl-4-pipéridinol est très différente de celles observées avec les composés amphiphiles synthétisés précédemment présentant soit un motif phénol encombré, soit un motif acide ascorbique. En effet, alors que les composés précédents inhibent dans un premier temps les réactions d'oxydation conduisant à une non consommation d'oxygène, le 1, 2, 2, 6, 6-pentaméthyl-4-pipéridinol utilisé à des concentrations inférieures ou égale à 2.10^{-2} M n'inhibe pas immédiatement la consommation d'oxygène, qui diminue seulement dans un deuxième temps. Ce comportement s'explique probablement par le mode d'action différent de ces différents antioxydants. Les phénols encombrés, tout comme la vitamine C, sont des antioxydants « sacrificiels » qui sont consommés au fur et à mesure qu'ils exercent leur pouvoir antioxydant en agissant comme piégeurs de radicaux libres. Au contraire, les amines encombrées réagiraient dans un premier temps oxydées pour conduire à 1 radical nitroxyl qui serait l'espèce antioxydante. Ces radicaux nitroxyl seraient à l'origine des propriétés antioxydantes en piégeant les radicaux libres permettant ainsi d'inhiber les réactions d'oxydation. Les produits ainsi formés se décomposeraient par la suite en espèces n'intervenant plus dans les phénomènes d'oxydation en régénérant le radical nitroxyl qui pourrait à nouveau exercer son activité antioxydante expliquant le pallier observé après un certain temps sur les courbes de la Figure 96.

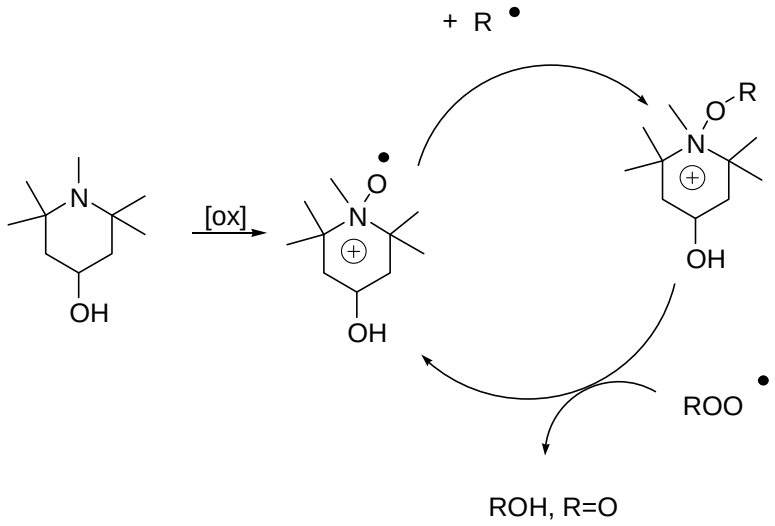


Figure 96. Mécanisme possible expliquant le mode de fonctionnement des amines encombrées

Le même type d'effet a pu être observé sur les composés amphiphile de type PiCn (Figure 95). Malheureusement, faute de temps, il n'a pas été possible de poursuivre plus en détail nos investigations sur cette dernière famille de composés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les objectifs que nous nous étions fixés au début de ce travail de thèse ont été en partie atteints. Différents composés amphiphiles présentant des propriétés antioxydantes ont pu être synthétisés à partir de différents motifs antioxydants et utilisés pour réaliser différentes formulations de traitement du bois.

Dans la première partie de ce travail, l'estérification de l'acide-3-(3,5-di-*ter*-butyl-4-hydroxyphényl)-propionique avec des polyéthylèneglycols de différentes tailles a permis d'obtenir les esters correspondant possédant ou non des propriétés tensioactives en fonction de la longueur de la chaîne PEG. Les produits obtenus à partir du PEG 400 et du PEG 600 présentent des propriétés amphiphiles et se comportent comme des tensioactifs non ioniques classiques. Ces composés présentent également des propriétés antioxydantes similaires à celles des phénols encombrés tels que le BHT. Solubles dans l'eau, ces composés ont été utilisés pour préparer des microémulsions contenant du propiconazole comme biocide. Utilisées à différentes dilutions, ces microémulsions ont permis de protéger efficacement des éprouvettes de hêtre exposées à l'action d'une pourriture blanche *Coriolus versicolor*. L'effet des propriétés antioxydantes reste toutefois limité dans la gamme de concentrations utilisées. En effet, les formulations contenant des tensioactifs à propriétés antioxydantes présentent peu de différences par rapport à des formulations renfermant la même quantité de propiconazole réalisées à partir d'un tensioactif classique tel que le Simulsol 5815 S. Si on considère des essais préliminaires réalisés avec le BHT, il semble que la concentration de l'antioxydant joue un rôle primordial sur son éventuel effet de synergie avec le propiconazole permettant d'empêcher la dégradation du bois. Les concentrations mises en jeu dans les différentes formulations impliquant des tensioactifs antioxydants seraient donc de ce fait insuffisantes pour pouvoir observer un effet significatif sur le champignon.

La deuxième partie de ce travail a consisté à évaluer les possibilités offertes par l'utilisation de tensioactifs cationiques facilement synthétisés à partir d'amines primaires et d'acide ascorbique ou d'acides gras et d'acide ascorbique dans le cas des composés bimodulaires. L'évaluation des propriétés physico-chimiques de ces produits a permis de montrer que ces derniers pouvaient présenter des propriétés amphiphiles en fonction de la longueur de la chaîne alkyle de l'amine utilisée et que les produits ainsi obtenus présentaient toujours des propriétés antioxydantes similaires à celles obtenu pour l'acide ascorbique. L'ascorbate de dodécylammonium a par la suite été retenu

pour effectuer différents essais de formulation et tests biologiques. Solubilisé dans un milieu de culture de type malt agar, ce produit est capable d'inhiber la croissance de *Coriolus versicolor*. Des études structure/activité réalisées en faisant varier la longueur de la chaîne alkyle et la nature du contre ion qui lui est associé ont permis de mettre en évidence que les propriétés tensioactives de ce composé étaient vraisemblablement à l'origine de ses propriétés biologiques. A titre de comparaison, la concentration minimale inhibitrice nécessaire pour annihiler la croissance du champignon est supérieure à celle du propiconazole, mais inférieure à celle du chlorure de didecyldiméthylammonium (DDAC), un autre fongicide fréquemment utilisé dans le domaine de la préservation du bois. L'ascorbate de dodécylammonium a également été utilisé pour réaliser différentes microémulsions contenant du propiconazole destinées à traiter des éprouvettes de hêtre. Comme précédemment, les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence un effet notoire de l'association d'un tensioactif antioxydant au biocide probablement du fait des concentrations impliquées. Utilisé seul à plus forte concentration, le produit est capable de prévenir de la dégradation du bois.

Même si les résultats obtenus n'ont pas toujours permis d'avoir les réponses escomptés, il n'en ressort pas moins que les tensioactifs antioxydants peuvent présenter des domaines d'applications intéressants qu'il conviendra d'étudier par le futur. La mise au point de la synthèse de ces composés et l'évaluation de leurs propriétés physico-chimiques constitue un point de départ intéressant pour le développement de nouvelles applications. La mise au point de produits « verts », de type deux en un (tensioactif et d'antioxydant), obtenus à partir de produits d'origine naturelle tels que l'acide ascorbique et des amines grasses dérivant des huiles végétales ou d'acides gras dans le cas des composés bimodulaires peut trouver des applications dans différents domaines dont ceux de la cosmétique ou de l'agroalimentaire.

Dans la troisième partie de ce travail, la condensation du 1,2,2,6,6-pentaméthylpiperidinol sur l'anhydride succinique a permis d'obtenir un motif amine encombré fonctionnalisé capable de réagir avec différentes amines grasses pour conduire à des sels présentant des propriétés amphiphiles en fonction de la longueur de la chaîne alkyl utilisée.

L'étude des propriétés antioxydantes de ces composés a confirmé leur aptitude à inhiber l'oxydation du linoléate de méthyle par l'oxygène en présence des radicaux libres. Le mode d'action de ces derniers semble toutefois différent de celui des autres produits étudiés dans la mesure ou l'inhibition de l'oxydation n'intervient pas dès le début de la réaction mais après un temps plus ou moins long au cours duquel on observe une concentration d'oxygène et après lequel la concentration d'oxygène ne varie plus. Contrairement aux dérivés de phénols encombrés et de l'acide ascorbique qui sont consommés au cours de la réaction d'oxydation, il semble que les dérivés d'amines encombrées

soient initialement oxydés pour conduire à un nytroxyle qui jouerait le rôle d'antioxydant en agissant de façon catalytique.

Ces différents résultats ont permis la publication de différents articles ou procceding, ainsi que différentes communications à des colloques nationaux ou internationaux :

- Evaluation de nouveaux tensioactifs antioxydants pour la formulation de produits de préservation du bois. T. Koumbi Mounanga, C. Gérardin, C. Selve, P. Gérardin. *Séminaire 2005 de l'Ecole Doctorale RP2E*, Nancy, 231-238, janvier 2005.

- Friendly environmentaly amphiphilic compounds with antioxidant properties : application to wood preservation. T. Koumbi-Mounanga, P. Gérardin, C. Selve, C. Gérardin. SFC- Eurochem Nancy 2005 - Université Henri Poincaré, Faculté des sciences et techniques, Vandoeuvre-les-Nancy, 28 Août - 1er Septembre 2005.

-Synthesis and properties of antioxidant of amphiphilic ascorbate salts.
T. Koumbi Mounanga, P. Gérardin, B. Poaty, D. Perrin, C. Gérardin. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 318, 134-140, 2008 (Annexe 1).

- Effect of amphiphilic antioxidant alkyl ammonium ascorbate on inhibition of fungal growth: Application to wood preservatives formulation. C. Gérardin, T. Koumbi Mounanga, P. Gérardin. 39th Annual Meeting of the International Research Group on Wood Protection, Istanbul, Turkey, 25-29 Mai 2008, IRG/WP 08-30466 (Annexe 2).

- Evaluation of antioxidant and fungicidal properties of amphiphilic ascorbate salts. C. Gérardin, T. Koumbi-Mounanga, P. Gérardin, 7th World Surfactants Congress, CESIO, 22-25 Juin 2008.

Même s'il reste encore divers points à compléter, l'ensemble des résultats est au final prometteur et ouvre la voie à de nombreuses perspectives.
Il sera intéressant d'approfondir et de compléter, en particulier, l'étude de dérivés de type amine encombrée et celle d'ascorbates d'ammonium.

Ainsi, dans le cas des dérivés du pipéridinol, dont les propriétés antioxydantes devront être approfondies, différentes variations structurales sont envisagées pour augmenter l'hydrophilie et la solubilité dans l'eau.

La famille des ascorbates d'ammonium pourra être élargie à l'association de l'acide ascorbique avec divers ammoniums quaternaires permettant d'apporter plus d'hydrophilie et d'augmenter l'activité fongique.

Enfin, au vue des résultats très intéressants obtenus avec cette dernière famille en matière d'activité biologique, des formulations correspondantes devront bien sûr être confirmées par d'autres tests avant d'être étendues à d'autres composés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-Abalea, V.; Cillard, J.; Dubos, M. P.; Sergent, O.; Cillard, P. and Morel, I. (1999) **Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures.** Free Rad Bio Med. 26(11-12), 1457-1466.

-Abe, Y.; Okada, S.; Horii, T.; Nakao, R.; Irie, M. (. (1987/ 2000) **MNDO-PM3 MO studies on the thermal enantiomerization of 1',3',3'-trimethyl-6-nitrospiro[2H-1-benzopyran-2,2'-indoline].** Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology, Section A: Molecular Crystals and Liquid Crystals, 345 95-100.

-Acda, M. N.; Morrell, J. J. and Levien, K. L. (2001) **Supercritical fluid impregnation of selected wood species with tebuconazole.** Wood Science and Technology. 35, 127-136.

-Adams, S. R.; Cockshull, K; E and Cave, C. R. J. (2001) **Effects of temperature on the growth and development of tomato fruits.** Ann. Bot. 88, 869-877.

-Agarwal, U. P.; Atalla, R. H. (1993/1998), **Using Raman spectroscopy to identify chromophores in lignin/lignocellulosics.** Book of Abstracts, 215th ACS National Meeting, Dallas, March 29-April 2 CELL-036. CODEN: 65 QTAA AN 1998:142230.

-Agarwal, U. P.; Atalla, R. H. (1986) **In-situ Raman microprobe studies of plant cell walls: macromolecular organization and compositional variability in the secondary wall of Picea mariana (Mill.) B.S.P.** Planta, 169(3), 325-32. CODEN: PLANAB ISSN: 0032-0935. CAN 106:47209 AN 1987:47209.

-Ahmed, M. O. (2001) **Comparison of impact of the different hydrophilic carriers on the properties of piperazine-containing drug.** Faculty of Pharmacy, Department of Industrial Pharmacy, Assiut University, Assiut, Egypt. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 51(3), 221-225. Publisher: Elsevier Science Ireland Ltd., CODEN: EJPBEL ISSN: 0939-6411.

-Akim, L. E.; Zyryanova, L. V.; Danilin, Z. V. (1963) **Dissolving pulp production in a Soviet mill.** Khim. Pereraobtka Drevesiny, Sb. 22 3-6. CAN 61: 55519 AN 1964: 455519.

-Alder, A.; Kohler, E. (1977/1998) **Results and advantages of simultaneously measured peroperative arterial and central venous pressure**. Helvetica chirurgica acta, 44(3), 451-61. Journal code: 2985095R. ISSN: 0018-0181. PubMed ID 617177 AN 79047815.

-Alegria, A. E.; Sanchez-Cruz, P. and Rivas, L. (2004) **Alkaline-earth cations enhance ortho-quinone catalyzed ascorbate oxidation**. Free R. Bio. & Med. 37 (10), 1631-1639.

-Alegria, A. E.; Rivera, L.; Cordones, E.; Castro, V. and Sanchez-cruz, P. (2002) **Role of membrane charge and semiquinone structure on oxygen consumption rates**. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2(11), 1823-1828.

-Allouch, M., Rosa Infante, Joan Seguer, M.-Jose Stebe and Claude Selve**.** (1996) **Nonionic Amphiphilic Compounds from Aspartic and Glutamic Acids as Structural Mimics of LecithinsMohamed,** JAOCS, Vol. 73, no. 1.

-Alliot, Vanessa. (1999) Thèse de l'Université Henri Poincaré Nancy I.

-Almajano, M. P.; Gordon, M. H. (2004) **Synergistic effect of BSA on antioxidant activities in model food emulsions.** Hugh Sinclair Sinclair Unit of Human nutrition, School of Food Biosciences, The university of reading, UK. Journal of the American Oil chemists' society. 81(3), 275-280.

-Al-Malaika, S. (2000) **Vitamin E: an effective biological antioxidant for polymer stabilisation**. Polymers & Polymer Composites, 8 (8), 537-542.

-Anderson, R. F.; Fisher, L. J.; Hara, Y.; Harris, T ; Mak, W. B.; Melton, L. D. and Packer, J. E. (2001) **Green tea catechins partially protect DNA from(.)OH radical-induced stand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals.** Carcinogenesis. 22(8), 1189-1193.

-Andrews, G. C. (1984) **5,6-Anhydro-l-ascorbic acid. A reactive intermediate for the formation of 6-substituted derivatives of L-ascorbic acid.** Carbohydrate research, 134, 321-326.

-Andrews, G. and Crawford, T. (1982) **Recent advances in the derivatization of l-ascorbic acid.** American Chemical Society. 82, 65-2393.

-Antonova, G. F.; Chaplygina, I. A.; Varaksina, T. N and Stasova, V. V. (2005) **Ascorbic acid and xylem development in trunks of the siberian larch Trees.** Russian Journal of Plant Physiology. 52 (1). 83-92.

-Ardon, Orly; Kerem, Zohar; Hadar, Yitzhak. (1998) **Enhancement of lignin degradation and laccase activity in Pleurotus ostreatus by cotton stalk extract.** Canadian Journal of Microbiology, 44(7), 676-680.

-Arrigoni, O. (1994) **Ascorbate system in plant development.** J. Bioenerg. Biomembr. 26, 407-419.

-Arya, S.P; Mahajan, M. and Jain, P. (2000) **Non-spectrosphotometric methods for the determination of Vitamin C.** Anal. Chim. Acta. 417(1), 1-14.

-Asada, K. (1994) **Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress, in Photo inhibition of photosynthesis, ed. by Barber, NR and Bowyer JR.** Biological Scientific Publishers, Oxford. 129-142.

-Asada, K. (1988) **Production, scavenging and action of active oxygen.** Protein, nucleic acid, enzyme. 33 (16), 2659-2664.

-Asada, K.; Chen, G. X. (1988) **Metabolism and function of glutathione in plants.** Protein, nucleic acid, enzyme. 33 (9), 1513-1521.

-Asada, K.; Nakano, M. (1988) **Ascorbate-peroxidase: scavenging system of hydrogen peroxide in chloroplasts.** Protein, nucleic acid, enzyme. 33 (16), 2776-2780.

-Atsunori, S. Kuniaki, O. and Jun, E. (1995) **preparation of ascorbic acid-2-phosphonate or-2-sulfonate salts.** (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan). Eur. Pat. Appl. 7pp.

-Aury, Sabrina; Rubini, Patrice; Gerardin, Christine; Selve, Claude. (2004) **Amphiphilic amide derivatives of D-glucaric acid. Synthesis and complexing properties toward lanthanide(III) ions.** European Journal of Organic Chemistry, (9), 2057-2066.

-Austria, R.; Semenzato, A. and Bettero, A. (1997). **Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations.** J Pharm Biomed Anal. 15, 785-801.

-Avellar, I. G. J.; godoy, K.; and Magalhaes, G. C. (2000) **New quaternary ammonium salts derived from cardanol and their use as phase transfer catalyst.** J. braz. Chem. Soc., 11(1), 22-26.

-Avigliano, L. and Finazzi-Agro, A. (1997) **Biological function and enzyme kinetics of ascorbate oxidase.** In: Messerschmidt A, ad. Blue multi-copper oxidases. Singapore: World Scientific. 265-278.

-AWPA. (1999) Book of standards. Woodstock, MD: American Wood Preservers' Association.

-Bachleitner-Hofmann, T.; Gisslinger, B.; Grunbeck, E. and Gisslinger, H. (2001) **Arsenic trioxide and ascorbic acid: Synergy with potential implication for the treatment of acute myeloîd leukaemia?** Britisn Journal of Haematology. 112, 783-786.

-Bakhsous, B.; Dumarçay S.; Gelhaye E., Gérardin P.. (2006) **Investigation of new wood preservation formulations based on synergies between antioxidant, 2-HPNO and Propiconazole.** 37th Annual Meeting of the International Research Group on Wood Preservation, 18-22 Juin,Tromsoe, Norway. IRG/WP 06-30401

-Balakrishnan, A.; Rege, B. D.; Amidon, G. L. and Polli, J. E. (2004) **Surfactant-mediated dissolution: contributions of solubility enhancement and relatively low micelle diffusivity.** Journal of Pharceutical Science. 93 (8), 2064-2075.

-Balland, Hervé. (2003) Thèse de l'Université Henri Poincaré Nancy I.

-Barralt, J.; Pouilloux, Y. (1997) **Synthesis of fatty amines. Selectivity control in presence of multifunctional caltalysts.** Catalysis today. 37, 137-153.

-Baumstark, R. and Tiarks, F. (2002) **Studies for a new generation of acrylic binders for exterior wood coatings.** Macromol. Symp. 187, 177-186.

-Baya, M.; Souloungangа, P.; Gelhaye, E.; Gérardin, P. (2001) **Fungicidal activity of □-thujaplicin analogues**. *Pest. Management Science*, 57, 833-838.

-Baylocq, D., Majcherczyk, C.; Rabaron, A.; Pellerin, F. (1983) **Action of ascorbic acid on primary amines and α-amino acids.** Lab. Chim. Anal., Univ. paris-Sud, Chatenay Malabry, Fr. Talanta. 30(1) 72-4.

-Beal, M. F. (1995) **Aging, energy, and oxidative stress in neurodegerative diseases.** Ann. Neurol. 38, 357-366.

-Behler, Ansgar; Biermann, Manfred; Hill, Karlheinz; Raths, Hans-Christian; Saint Victor, Marie-Esther; Uphues, Gunter. (2001) **Industrial surfactant syntheses.** Surfactant Science Series , 100(Reactions and Synthesis in Surfactant Systems), 1-44.

-Berg, K. P.; Kiss, J. (1976) **Halo derivatives of deoxyascorbic acids.** (Hoffmann-La roche, F., und Co., A.-G., Switz.) ger. Offen. 25pp. **Halogen derivatives of ascorbic acid and d-araboascorbic acid antioxidants.** US,4,043,937.

-Berthod, Alain. (1983) **Physicochemical structures of liquid disperse systems, micelles, emulsions, and microemulsions.** Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique, 80(5), 407-24. CODEN: JCPBAN ISSN:0021-7689. CAN 99:111150.

-Berthod, Alain; Georges, Joseph. (1983) **Water-dichloromethane microemulsions: phase diagram, viscosity, electrochemical properties.** Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique, 80(2), 245-9. CODEN: JCPBAN ISSN: 0021-7689. CAN 99:11312.

-Berthod, Alain; Georges, Joseph. (1983) **Electrochemical and kinetic study of oxygen in a perfluorotributylamine emulsion.** Analytica Chimica Acta, 147 41-51.

-Bertwob, A. (1983) **Mise au point, structures physicochimiques des milieux dispersés, micelles, émulsions et microémulsions. Journal de chimie physique**, 80, n°5, 407-423.

-Bigorra, J.; Bonastre, N.; Pl, R.; Schmid, K. H.; Stanislowski, D. (1996) **Low foaming surfactants.** World Surfactants Congress, 4th, Barcelona, June 3-7, 1996, 1 566-577. CODEN: 63KCAH CAN 125: 199067 AN 1996:567705.

-Bilia, A. R.; Bergonzi, M. C.; Vincieri, F. F.; Lo Nostro, P. and Morris, G. A. (2002) **A diffusion-ordered NMR spectroscopy study of the solubilization of artemisinin by octanoyl-6-O-ascorbic acid micelles.** Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence, Italy. Journal of Pharmaceutical Sciences. 91 (10), 2265-2270.

-Bocharov, V. V.; Frolov, A. E. (1983) **Wetting power of surfactant solutions.** Vses. Nauchno-Issled. Inst. Poverkhn.-Akt. Veshchestv, USSR. Zhurnal Prikladnoi Khimii (Sankt-Peterburg, Russian Federation), 56 (10), 2361-3.

-Bock, K.; Lundt, I. and Pedersen, C. (1979) **Preparation of some bromodeoxyaldonic acids.** Carbohydrate Research. 68, 313-319.

-Boehm, H.; Boeing, H.; Hempe, L. J.; Raab, B. and Kroke, A. (1998) **Flavonols, flavones, and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases.** Z Ernahrungswiss. 37(2), 147-163.

-Bohle, U-R.; Hilger, H. H. and Martin, W. F. (1996) **Island colonization and evolution of the insular woody habit in *Echium L*. (Boraginaccae).** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 11740-11745.

-Bolton, J. L. (2002) **Quinoïds, quinoïd radicalas and phenoxyl formed from estrogens antiestrogens.** Toxicology. 177, 55-65.

-Borgin, K. and Corbett, K. (1970a) **The stability and weathering properties of wood treated with various oils.** Plast Paint Rubber. 14 (5), 69-72.

-Bourgeois, J-F. (1981) **Propriétés antioxygènes des tocophérols et du palmitate d'ascorbyle dans les matières grasses**. Rev. Fr. Corps Gras, 28, n°9, 353-356.

-Branca, C. and Di Blasi, C. (2003) **Global interinsic kinetics of wood oxidation.** Elsevier. Science direct. Fuel. 83. 81-87.

-Breen, Alec; Singleton, Fred L. (1999) **Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping.** Current Opinion in Biotechnology, 10(3), 252-258.

-Brennan, R. J. and Schiestl, R. H. (1999) **The aromatic amine carcinogens o-toluidine and o-anisidine induce free radicals and intrachromosomal recombination in Saccharomyces cerevisiae**. Mutation Research, 430 (1), 37-45.

-Broze, Guy. (2002) **Impact of micellar strucure on rheology and performance in superwetting cleaners.** Abstracts of Papers, 224th ACS National Meeting, Boston, MA, United States, August 18-22, 2002, PHYS-129.

-Buncel, E. Jackson, K. G.; Jones, J. K. (1965) **The l-ascorbate ion as an ambident nucleophile.** Chemistry & industry. 2. 89.

-Burt, S. (2004) **Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review.** Int. J. Food Microbiol. 94, 223-253.

-Buttner, G.R. (1988). **In the absence of catalytic metals ascorbate does not antioxidize at pH7: ascorbate as a test for catalytic metals.** J. Bio Chem. Biophys. Methods. 16, 27-40.

-Cabelli, D. E.; Bielski, B. H. J.; Seib, P. A. (1984) **A pulse radiolysis study of the oxidation of methyl-substituted ascorbates.** Dep. Chem., Brookhaven natl. lab., Upton, NY, USA. Radiation physics and chemistry. 23(4), 419-29.

-Buzier, M.; Ravey, J. C. (1985) **Salt and temperature dependence of ternary systems with nonionic surfactants. II. Study of the three-phase domains.** Journal of Colloid and Interface Science, 103(2), 594-6. CODEN: JCISA5 ISSN: 0021-9797. CAN 102: 120301.

-Buzier, Martine; Ravey, Jean Claude. (1981/1983) **Solubilization properties of nonionic surfactants. I. Evolution of the ternary phase diagrams with temperature, salinity, HLB, and ACN.** Journal of Colloid and Interface Science, 91(1), 20-33. CODEN: JCISA5 ISSN: 0021-9797. CAN 98:41147 AN 1983: 41147.

-Cai, Q.; Wei H; Rahn, R. O. and Zhang, R. (1997) **Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254 nm) radiation-induced formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA**. Cancer Lett. 119, 99.

-Cameron, M. D. and Aust, S. D. (2001) **Cellobiose dehydrogenase- an extracellular fungal flavocytochrome.** Enzyme Microb. Technol. 28, 129-138.

-Carlson, Thommy. (1984/1986) **New Surfactants.** Eur. Pat. EP 0 182934. Appl., 13 pp.

-Carmona, Ribeiro, A.M., Vieira D.B.; Lincopan, N. (2006). **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**. Cationic surfactants and lipids as anti-infective agents. 5 (1) 33-54.

-Carr, A. C and Frei, B. (1999) **Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in human.** Am. J. Clin. Nutr. 69, 1086-1607.

-Chengxin, C.; Luhua, Y.; Wei, C. and Kuanhong, X. (1999) **Electrochemical oxidation mechanism of ascorbic acid on activated glassy carbon electrode.** Department of Chemistry, Nanjing normal University, Nanjing, peop. Pep China. Nanjing Shida Xuebao, Ziran Kexueban. 22(1), 59-63.

-Chepda, T.; Cadau, M.; Lassabliere, F.; Reynaud, E.; Perier, C.; Frey, J. and Chamson, A. (2001). **Synergy between ascorbate and α-tocopherol on fibroblasts in culture.** Life Sciences. 69, 1587-1596.

-Choi, Suk Bong. (2005) **Ceramic waterproof paint using resin, industrial waste such as furnace slag, coal ash, etc., ceramic powder, clay or kaolin, inorganic pigment and nonionic surfactant.** Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo, No pp. given.

-Corbat Holding, SA. (2006) **Industrie du bois.** Vendlincourt/Gloyelier/Les Breuleux/Badevel.

-Courtois, B; Sageot, H; Heisel, E. (2006) **Produits de traitements du bois : composition, dangers, mesures de préventions.** INRS (institut national de recherche et de sécurité) ED 981.

-Climent, M. A.; Rode, A; Valls, M.J.; Peres, M. J.; Fallu, M. J. and Aldaz, A. (1994) **FTIR study of surface structure influence on the electrochemical behavior of the ascorbate anion at platinum electrodes in neutral solutions.** J. Chem. Soc. Faraday Trans. 90, 609.

-Conklin, P. L. and Barth, C. (2004) **Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens and the ouest of senescence.** Plant Cell Environ. 27, 950-970.

-Cordoda-Pedregosa, M. del C.; Cordoda, F.; Villalba, J. M. and Gonzalez-Reyes J. A. (2003) **Differential distribution of ascorbic acid, peroxidase activity and hydrogen peroxide along the root amis in *Allium cepa L.* and its possible relation ship with cell growth and differentiation**. Protoplasma. 221, 57-65.

-Cort, W. M. (1982) **Antioxidant properties of ascorbic acid in foods. In "advances in chemistry series, No 200, Ascorbic acid: Chemistry, Metabolism, and Uses", eds.** Seib, P. A. and Tolbert, B. M. **American chemestry society.** Washington DC. 31-45.

-Crestini, C. and D'Auria, M. (1997) **Singlet oxygen in the photodegradation of lignin models.** Tetrahedron, 53(23), 7877-7888. CODEN: TETRAB ISSN: 0040-4020. CAN 127: 67501 AN 1997: 407463.

-Crudden, Joseph, J. (1999) **The properties and industrial applications of N-acyl ED3A chelating surfactants.** Special Publication - Royal Society of Chemistry, 230 (Industrial Applications of Surfactants IV), 130-150.

-Cui, F. and Preston, A. F. (2006) **Emulsion compositions for wood protection**. US Patent Application 2006/0057300 A1.

-Cullen, D.; Kersten, P. J. (2004) **Enzymology and molecular biology of lignin degradation.** Mycota, 3(2), 249-273. CODEN: 63BMA2 CAN 142: 276495.

-Cuvelier, C.; Cabaraux, J.-F. ; Dufrasne, I. ; Hornick, J.-L. and Istasse, L. (2004) **Acides gras : nomenclature et sources alimentaires.** Ann. Méd. Vét. 148, 133-140.

-Dalpiaz, A.; Pavan, B.; Scaglianti, M.; Vitali, F.; Bortolotti, F.; Biondi, C.; Scatturin, A. and Manfredini, S. (2005) **Vitamin C and 6-amino-vitamin C conjugates of diclofenac : synthesis and evaluation.** International Journal of Pharmaceutics. 291, 171-181.

-Davies, J. T.; Haydon, D. A. (1957) **Spontaneous emulsification.** Proc. Intern. Congr. Surface Activity, 2nd, London, 1957, 1 417-25. CAN 55:135100 AN 1961:135100.

-Davies, J. T. (1957) **A quantitative kinetic theory of emulsion type. I. Physical chemistry of the emulsifying agent.** Proc. Intern. Congr. Surface Act. 2nd, London, 1957, 1 426-38.

-Davies, J. T.; Taylor, F. H. (1957) **Molecular shape, size, and adsorption in olfaction.** Proc. Intern. Cong. Surface Activity, 2nd, London, 1957, 4 329-40. CAN 54:129407.

-Davies, J. T.; Taylor, F. H. (1957) **The olfactory threshold.** Mem. services chim. etat, Volume Date 1956-1957, 41 359-62. CAN 54:121277 AN 1960:121277.

-Davies, J. T.; Smith, J. A. Collis; Humphreys, D. G. (1957) **Rates of adsorption at an oil-water interface-a technique for times greater than 0.1 second.** Proc. Intern. Congr. Surface Activity, 2nd, London, 1957, 1 281-7. CAN 53:75907 AN 1959:75907.

-Davies, J. T. (1957) **Study of foam stabilizers using a new ("viscous-traction") surface viscometer.** Proc. Intern. Congr. Surface Activity, 2nd, London, (1), 220-4. CAN 53:75621.

-Davies, J. T. (1957) **Rate of adsorption at the oil-water interface.** Memorial des Services Chimiques de l'Etat, Volume Date 1956-1957, 41 323, discussion 324-5.

-Davies, M. B.; Austin, J. and Partridge, D. A. (1991) **Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry.** Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK.

-Denoyelle, S. Polidori, A. Prunelle, M. Vuillaume, P. Y. Laurent, S. El Azhary, Y. Pucci, B. (**2006**) *New J. Chem.*

-Depew, M. C.; Chan, M. and Wan, J. K. S. (1984) **An electron spin resonance study of the interactions between amines and l-ascorbic acid in organic solvents.** Journal of magnetic resonance. 57, 297-302.

-Devinsky, F. (1985) **Amine oxides. X. non-aromatic amine oxides: physicochemical properties and some characteristic reactions.** Acta Fac. Pharm. Univ. Comenianae. 39, 173-96.

-Deyoe, C. W.; Seib, P. A.; Hoseney, R. C. (1976) **L-ascorbate 2-surfate from L-ascorbic acid.** (Kansas State University Research Foundation, USA). U.S. 8pp. US 3954809.

-Dikusar, EA.; Kozlov, NG.; Mel'nichuk, LA.(2004) **Salts of l-ascorbic acid with certain substituted amines and triphenylphosphine.** Chemistry of Natural Coumpounds.40 (4).

-Diouf, P.N.; Delbarre, N.; Perrin, D.; Gérardin, P.; Rapin, C.; Jacquot, JP.; Gelhaye, E.(2002) **Influence of tropolone on *Poria placenta* wood degradation**. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4377-4382.

-Du, J. and Gebicki, J-M. (2004) **Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals.** Int. J. Biochem Cell Biol. 36, 2334-2343.

-Dumarçay, S.; Bakhsous B.; Gelhaye E.; Gérardin P. (2005) **Recherche de synergies entre chélateurs, antioxydants et biocides pour la mise au point de nouvelles formulations de préservation du bois**. *6ème Colloque Sciences et Industrie du Bois*. 2, 3 et 4 Novembre 2004, Epinal. Les Cahiers Scientifiques du Bois, vol. 3, 191-201.

-Duthie, S. J.; Johnson W. and Dobson V. L. (1997a) **The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) and growth in human cells**. Mutat Res. 390(1,2), 141-151.

-Duthie, S.J.; Collins, A.R.; Duthie, G. G. and Dobson, V. L. (1997b) **Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human lymphocytes.** Mutat Res. 393(3), 223-231.

-Ebringerova, A.; Srokova, I.; Talaba, P.; Kacurakova, M. and Hromadkova, Z. (1998) **Amphiphilic Beech wood glucuronoxylan derivatives.** J. App. Pol. Science. 67, 1523-1530.

-Edwards, A. B. (1961) **The fruit fly problem in Australia.** Outlook on Agriculture, 3 116-22. CODEN: OUAGA8 ISSN:0030-7270. CAN 57:58096 AN 1962:458096

-Efanov, M. V.; Galochkin, A. I.; Shott, P. R. and Dudkin, D. V. (2001) **Ammoniated products of aspen wood oxidation.** Chemistry of Natural Compounds. 37 (4).

-Ella-Menye, J.R. Sharma, V. Wang, G. (2005) **New Synthesis of Chiral 1,3-Oxazinan-2-ones from Carbohydrate Derivatives.**J. Org. Chem. 70 463–469.

El Moujahid, C.; Ravey, J. C.; Schmitt, V.; Stebe, M. J. (1998) **Comparative structural study of aqueous fluorinated non-ionic micelles.**Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, 136(3), 289-297.

-El Moujahid C. (1993) Thèse de l'Université de Nancy.

-Emmanouil, V.; Ghoul, M. El; Andre-Barres, C.; Guidetti, B.; Rico-Lattes, I.; Lattes, A. (1998) **Synthesis of New Long-Chain Fluoroalkyl Glycolipids : Relation of Amphiphilic Properties to Morphology of Supramolecular Assemblies.** Langmuir, 14(19), 5389-5395.

-Enoki, A.; Tanaka, H.; and Fuse, G. (1989/1997) **Relationship between degradation of wood and production of H2O2-producing or one electron oxidases by brown-rot fungi.** Wood Sci. Technol. 23, 1-12.

-Enoki, A.; Hirano, T. and Tanaka, H. (1992) **Extracellular substance from the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum* that produces and reduces hydrogen peroxide.** Mater. Org. (Berlin), 27, 247-261.

-Esker, Becker, Jamin, Beppu, Renneckar, and Glasser. (2004) **Self-assembly behavior of some co- and heteropolysaccharides related to hemicelluloses**. ACS Symp. Ser. 864, 198.

-European standard. (1979) **Produits de préservation du bois determination du seuil d'efficacité contre les champignons basidiomycètes lignovores cultivés sur milieu gélosé.** Comité européen de normalisation. Deuxième édition.

-Fahrni, P. Siegfried, T. (1983) **Ascorbic acid.** (Hoffmann-la roche, F.; und Co, A-G., Switz.). 23pp. EP 86324.

-Fantini, Jacques; Hammache, Djilali; Delezay, Olivier; Yahi, Nouara; Andre-Barres, Christiane; Rico-Lattes, Isabelle; Lattes, Armand. (1997) **Synthetic soluble analogs of galactosylceramide (GalCer) bind to the V3 domain of HIV-1 gp120 and inhibit HIV-1-induced fusion and entry.** Journal of Biological Chemistry, 272(11), 7245-7252.

-Faroux-Corlay, B. Clary, L. Gadras, C. Hammache, D. Greiner, J. Santaella, C. Aubertin, Vierling, A. M. Fantini, P. (**2000**) **Synthesis of single- and double-chain fluorocarbon and hydrocarbon galactosyl amphiphiles and their anti-HIV-1 activity.** J. *Carbohydrate Research* (327) 223.

-Feist, William C.; Hon, David N. S. (1984) **Chemistry of weathering and protection.** Advances in Chemistry Series, 207(Chem. Solid Wood), 401-51. CODEN: ADCSAJ ISSN:0065-2393. CAN 101:56650 AN 1984:456650.

-Fengel, Dietrich; Wegener, Gerd. (1984) **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**, 613 pp. CAN 101:112671 AN 1984:512671.

-Fengel, D.; Shao, Xaioxun. (1984) **Lignin of the bamboo species Phyllostachys makinoi Hay.** Nanjing Linxueyuan Xuebao, (3), 10-16. CODEN: NLXUER ISSN: 1000-2448. CAN 102:97163 AN 1985:97163.

-Ferguson, L. R. (2001) **Role of plant polyphenols in genomic stability.** Mutat Res. 475(1, 2), 89-111.

-Ferm, R.; Kringstad, K. P.; Cowling, E. B. (1972) **Formation of free radicals in milled wood lignin and syringaldehyde by phenol-oxidizing enzymes.** Svensk Papperstidning, 75(21), 859-65. CODEN: SVPAAE ISSN: 0283-6831. CAN 78:45289 AN 1973:45289.

-Fletcher, Kristin A.; Pandey, Siddharth. (2003) **Determination of the formation of self-assembled molecularly ordered media within select room-temperature ionic liquids.** Abstracts of Papers, 225th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, March 23-27, 2003, ANYL-156.

-Foyer, C. H and Noctor, G. (2005) **Oxidant and antioxidant signalling in plants: re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological content.** Plant Cell. Environ. 28, 1056-1071.

-Fredon, E. (2001) **Obtention de films plastiques hydrophobes à partir de polysaccharides contenus dans des co-produits agricoles.** Thèse de l'université Paul Sabatier de toulouse.

-Frei, B.; England, L. and Ames, B.N. (1989) **Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma.** Proc; Natr. Acad. Sci. USA. 86, 6377-6381.

-Fritschi, J.; Lichtenberg, and Florian**.** (2000) **Aqueous, boric acid-based wood preservative compositions**. EP 1025967 A1.

-Frykman, H. B.; Isbell, T. and Cermak, S. C. (2000) **5-Hydroxy fatty acid amides from δ-lactones and alkyl glucamines.** Journal of surfactants and Detegents, 3(2).

-Gagnaire, Bernard. (1967) **Surfactants.** Soc. Chim. Gerland, Lyons, Fr. Double-Liaison, No. 143 823-32.

-Gan, L.; Seib, P. A. (1998) **Preparation and antioxidant activities of phenolic esters and ethers of l-ascorbic acid.** Department of Grain Science and Industry, Kansas State University, Manhattan, KS, USA. Journal of Carbohydrate chemistry. 17(3), 397-404.

-Gan, L.; Seib, P. A. (1991) **Synthesis of d-erythroascorbic acid from D-glucose.** Department of Grain Science and Industry, Kansas State University, Manhattan, KS, USA. Journal of Carbohydrate chemistry. 220, 117-25.

-Gao, L. Y.; Guo, W. Y.; Tu, D. M. (2003) **Interfacial microstructure and withstand voltage of polyethylene for power cables.** IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation, 10(2), 233-239.

-Gartner, W. (1962) **The use of peroxide in the paper and cellulose industry.** Zellstoff und Papier (Leipzig), 11 (No. 4), 136-42. CODEN: ZLPAAL ISSN: 0044-3867. CAN 57: 37159 AN 1962:437159.

-Gaucheron, J. Santaella, C. Vierling, P.(**2001**) **Highly Fluorinated Lipospermines for Gene Transfer: Synthesis and Evaluation of Their in Vitro Transfection Efficiency.** *Bioconjugate Chem.* (12) 569.

-Gerardin, P. (2003) **Chimie et Biologie de la Preservation.** Cours de chimie de la préservation du matériau bois, Dea sciences du bois.

-Gérardin, P.; Dumarçay, S.; Gelhaye, E.; Mbamba, A.; Mussavu, V. (6-10 Juin 2004) **Evaluation of hydroxamates as wood preservatives**. *35th Annual Meeting of the International Research Group on Wood Preservation*, Ljubljana, Slovenia;. IRG/WP 04-30330.

-Gezer, E.D.; Michael J.H and Morrell J.J. (1999) **Effectes of glycol on leachability and efficacity of boron wood preservatives**. Wood fiber sci. 31(2), 136-142.

-Gibbs, J. W. (1903) **Diagrammes et Surfaces thermodynamiques**. 86 pp. CAN 0:6096 AN 1906:6096

-Gibbs, J. Willard. (1902) **Elementary principles in statistical mechanics.** 207 pp. CAN 0:5028 AN 1906:5028

-Gierer, Josef Franz; Norin, Carl Torbjorn. (1972) **Lignin-preserving bleaching of cellulose pulp.** U.S. 5 pp. CODEN: USXXAM US 3694309 19720926 CAN 78:17946 AN 1973:17946.

-Gierer, J.; Yang, E. and Reitberger, T. (1994) **On the significance the superoxide radical ($O2^{-}$) in oxidative delignification, studied with 4-t-butylsyrincol. Part 1. The redaction mechanism of aromatic ring opening.** Holzforschung. 48, 405-414.

-Gillham, D. J. and Dodge, A. D. (1987) **The mode of action of nitrodiphenyl ether herbicides.** Plant Sci. 50, 105-109.

-Ginn, M. E.; Kinney, F. B.; Harris, J. C. (1960) **Effect of temperature on critical micelle concentration.** Monsanto Chem. Co., Dayton, O. Journal of the American Oil Chemists' Society, 37 183-7.

-Glasser, Kaar, Jain, and Sealey. (2000) **Isolation options for non-crystalline heteropolysaccharides (HetPS).** Cellulose. 7 (3), 299.

-Goodell, B.; Jellison, J.; Liu, J.; Daniel, G.; Paszcyznski, A.; Fekete, F.; Krishnamurthy, S.; Jun, L.; Xu, G. (1997) **Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood.** Journal of Biotechnology, 53(2,3), 133-162.

-Gradwell, Renneckar, Esker, Heinze, Gatenholm, Vaca-Garcia, and Glasser. (2004) **Surface modification of cellulose fibers: towards wood composites by biomimetics.** C.R.Biologies 327(9-10), 945.

-Greek, Bruce F. (1978/**1990**) **Shell Chemical's Jack St. Clair wins SCI medal.** Chemical & Engineering News, 56(42), 11-12.

-Gressin, J. C.; Gordon, J. C. and Berg, R.A. (1993) **Regulation of collagen synthesis in human dermal fibroblasts by the sodium magnesium salt of ascorbyl-2-phosphate.** Skin Pharma-Col. 6, 65-71.

-Griffin, W. (1949) **Classification of surface-active agents by "HLB"** Meeting, Chicago Chapter, Chicago.III. Jornal of the society of Cosmetic Chemists, 311-326.

-Griffin, W. C.; Behrens, R. W. (1953/1954) **A basis for tests for emulsifiable concentrates of agricultural chemicals.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1 720-4. *J. Soc. Cosmet. Chemists*, **5**, 249.

-Grigor'ev, S. N.; Makagonova, N. N.; Abramson, A. A. (1987) **Experimental dependences of the emulsifying power of surfactant compositions and electrolytes.** Leningr. Tekhnol. Inst., Leningrad, USSR. Kolloidnyi Zhurnal, 49(3), 442-6.

-Guajardo, M. H. Terrasa, Ana M. and Calata, A. (2006) **Lipid-protein modifications during ascorbate-Fe^{2+} peroxidation of photoreceptor membranes: Protective effect of melatonin.** Journal of Pineal Research. 41, 201-210.

-Guillen, F.; Martinez. M. J.; Munoz, C. and Martinez, A. T. (1997) **Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical.** Arch. Biochem. Biophys. 339, 190-199.

-Guillen, F.; Munoz, C.; Gomez-Toribio, V.; Martinez, A. T. and Martinez, M. J. (2000a) **Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii.*** Appl. Environ. Microbiol. 66, 170-175.

-Guillen, F.; Gomez-Toribio, V.; Munoz, C.; Martinez, M ; J. and Martinez, A. T. (2000b) **Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase.** Arch. Biochem. Biophys. 383, 142-147.

-Haemmerli, S. D.; Schoemaker, H. E.; Schmidt, H. W. H. and Leisola, M. S. A. (1987) **Oxidation of veratryl alcohol by the lignin peroxidase of *phanerochaete chrysosporium.*** FEBS Lett. 220, 149-154.

-Hammel, K.E. (1997) **Fungal degradation of lignin.** CAB International Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition. Eds Cadisch, G. and Giller, K.E. pp 33-45.

-Han, Gyu Seong; Saka, Shiro; Shiraishi, Nobuo. (1991) **Composites of wood and polypropylenes.V. Morphological study of composite by TEM-EDXA.** Mokuzai Gakkaishi, 37(3), 241-6.

-Haruna, T. (1995) **Aspects of stabilization with phosphorus antioxidants in polymers**. Angewandte Makromolekulare Chemie, 232, 119-31.

-Hashimoto, Masayuki. (2006) **Dynamic properties of surfactants: ideal surfactant structures in industrial applications.** Fain Kemikaru, 35(8), 49-55.

-Heitner, Cyril. (1993) **Light-induced yellowing of wood-containing papers. An evolution of the mechanism.** ACS Symposium Series, 531(Photochemistry of Lignocellulosic Materials), 2-25.

-Heitner, Cyril. (1993) **Inhibition of light-induced yellowing of lignin-containing paper.** ACS Symposium Series, 531(Photochemistry of Lignocellulosic Materials), 192-204.

-Heitner, Cyril; Scaiano, J. C.; Editors. (1993) **Photochemistry of Lignocellulosic Materials. (Developed from a Symposium Sponsored by the Division of Cellulose, Paper and Textile at the 203rd National Meeting of the American Chemical Society, San Francisco, California, April 5-10, 1992.) [In: ACS Symp. Ser., 1993 ; 531].** 223pp.

-Hellsten, Martin. (1986) **The industrial applications of nonionic surfactants.** Tenside, Surfactants, Detergents, 23(6), 337-41.

-Herrick, F. W.; Casebier, R. L.; Hamilton, J. K.; Wilson, J. D. (1975) **Mannose chemicals.** Applied Polymer Symposia, 28(Proc. Cellul. Conf., 8th, 1975, Vol. 1), 93-108.

-Hernandez, J. A.; Olmos, E.; Corpas, F. J.; Sevilla, F. and del Rio, L. A. (1995). **Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants.** Plant Sci. 105(2), 151-167.

-Hernould, M; Suharsono S; Litvak S; Araya A; Mouras A (1993) **Male-sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited atp9 mitochondrial gene from wheat**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 90(6), 2370-4.

-Hideyuki, T.; Akio, S.; Toshio, K.; Hideo, T.; Suenori, N.; Katsuji, M. (1998) **Antioxidants and heat stabilizers from piperidinol phosphate or phosphate salts for use in resins.** (Sakai, Chemical Industrry Co., ltd., Sakai, Japan) Jpn. Kokai Tokkyo Koho. 11pp. JP 10298439.

-Hill, Callum. (2006) **Wood Modification, Chemical Thermal and other Processes.** Wiley serie in Renewable Resources. ISB NO-470-02172-1. 99-126.

-Hill, Callum. (2006) **Chemical Modification of Wood (I) : Acetic Anhydride Modification.** Wiley serie in Renewable Resources. ISB NO-470-02172-1. 99-126. 45-76.

-Hill, Callum. (2006) **Chemical Modification of Wood (II) : Reaction with other Chemicals.** Wiley serie in Renewable Resources. ISB NO-470-02172-1. 99-126. 77-97.

-Hirano, T.; Tanaka, H.; and Enoki, A. (1997) **Relationship between production of hydroxyl radicals and degradation of wood by the brown-rot fungus *Tyromyces palustris.*** Holsforschung. 51, 389-395.

-Hirano, T.; Tanaka, H. and Enoki, A. (1995) **Extracellular substance from the brown-rot basidiomycete *Tyromyces palustris* that reduces molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric ion to ferrous iron.** Mokuzai Gakkaishi. 41, 334-341.

-Holland, D.; Ben-Hayyim, G.; Faltin, Z. Camoin, L.; Strosberg, A. D. and Eshdat, Y. (1993) **Molecular characterization of salt-stress-associated protein in citrus: protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidases**. Plant Mol. Biol. 21(5), 923-927.

-Hon, David N. S.; Shiraishi, Nobuo; Editors. (1991) **Wood and Cellulosic Chemistry**, 1020 pp.CAN 114:104611 AN 1991:104611.

-Hooley, R. A. and Patel, D. (2005) **Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials.** Int J. Food Microbiol. 22, 237-292.

-Host, S. Rocher, M. (**2001**) **Tensioactifs et oléagineux.** ADEME.

-Hwang, W. J.; Kartal, S. N.; Shinoda, K. and Imamura, Y.(2005) **Surface treatment for preventing decay and termite attack in wood using didecyl dimethyl ammonium tetrafluoroborate (DBF) incorporated with acryl-silicon type resin.** Holz als Roh-und Werkstoff. 63, 204-208.

-Hyvonen, A.; Piltonen, P. and Niinimaki, J. (2006) **Tall oil/water-emulsions as water repellents for scots pine sapwood.** Holz als Roh- und Werkstoff. 64, 68-73.

-Imahori, Seiichi; Kimura, Wasaburo. (1962) **Evaluation of dye-dispersing power by a semimicro azo pigment electrophotometric method.** Univ. Nagoya, Japan. Yukagaku, 11 470-3.

-Imanari, Masao; Yanadori, Michio. (1999) **Energy loss reduction technology of pump by addition of a surfactant to a water solution.** Mech. Eng. Res. Lab., Hitachi Ltd., Japan. Reito, 74(4), 289-295.

-Invernizzi, F.; Gafa, S. (1973) **Biodegradation of nonionic surfactants. I. Analytical methods for nonionic surfactants applied to biodegradation tests.** Lab. Detergenti Tensioattivi, Montedison, Rho/Milan, I. R. Italiana delle Sostanze Grasse, 50(10), 365-72.

-Jakobs, B.; Breitzke, B.; Stolz, M.; Verzellino, R. (2005) **Low foaming surfactant systems for industrial applications.** SOFW Journal, 131(6), 63-64, 66-68.

-Jain, A.; Martin, M. C.; Parveen, N.; Khan, N. U.; Parish, J.H. and Hadi, S. M. (1999). **Reactivities of flavonoids with different hydroxyl substituents for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II).** Phytother Res. 13(7) 609-612.

-Jernow, j.; Blount, J.; Oliveto, E.; Perrotta, A.; Rosen, P.; Toome, V. (1979) **Structural determination of ascorbic 2-O-phosphate formed via acid hydrolysis of ascorbic acid 3-Ophosphinate.** Dep. Chem. Res., Hoffmann-la Roche Inc., Nutley, NJ, USA. Tetrahedron. 35(12), 1483-6.

-Jiang, T.; Mo, F.; Song, A. Wang, Z.; Wu, H.; Yuan, H. (2004) **Investigation on the properties of the surfactant and antioxidant of dodecanoyl ascorbic acid.** School f Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, peop. Rep. China. Shenyang yaoke daxue Xuebao. 21(5), 333-336.

-Jiang, X and Walker, L. (2007a) **Amine Oxides for Use in Wood Protection: I. A Formulation Adjuvant and performance Enhancer for Wood.** Lonza Inc. 25 Commerce Drive, Allendale, NJ 07401.USA. International Research Group on Wood Preservation. Doc. No. IRG/WP 07-30425.

-Jiang, X and Walker, L. (2007b) **Amine Oxides for Use in Wood Protection: II. Water Repellent Agents for Wood.** Lonza Inc. 25 Commerce Drive, Allendale, NJ 07401.USA. International Research Group on Wood Preservation. Doc. No. IRG/WP 07-30426.

-Jin, L.; Roberts, D. M. and Preston. (1992) **Influence of water-borne preservatives on water repellency and the impact of addition of water repellent additives.** International Research Group on Wood Preservation. Doc. No. IRG/WP, 92-3704.

-Jodin, P. (1994) **Le bois, matériel d'ingénierie.** ARBOLOR.

-Jones, J L; Leary M R (1994) **Effects of appearance-based admonitions against sun exposure on tanning intentions in young adults**. Health psychology: official journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association, 13(1), 86-90. Journal code: 8211523. ISSN: 0278-6133. PubMed ID 8168475 AN 94222021.

-Joy, R. W.; Patel, K. R. and Thorpe T. A. (1988) **AsA. Enhancement of organogenesis in tabacco callus.** Plant Cell. Tissue Organ. Cult. 13, 219-228.

-Juang, Ruey-Shin; Lin, Kung-Hsuan. (2004) **Ultrasound-assisted production of W/O emulsions in liquid surfactant membrane processes.** Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, 238(1-3), 43-49.

-Kalyanaraman, B. (1990) **Characterization of o-semiquinone radicals in biolocal systems.** Methods Enzymol. 186, 333-343.

-Kariyone, Takao. (1990) **Properties and use of surfactants.** Yushi, 43(1),76-9.

-Karsa, D. R.; Editor. (1990) **Industrial Applications of Surfactants II. Proceedings of a Symposium, University of Salford, 19th-20th April, 1989. [In: Spec. Publ. R. Soc. Chem., 1990; 77]**, 403 pp. CAN 113:8436 AN 1990:408436.

-Karsa, David R.; Editor. (1999) **Industrial Applications of Surfactants IV. (Proceedings of a Meeting held at the University of Salford, 31 March-2 April 1998.) [In: Spec. Publ. - R. Soc. Chem., 1999; 230].** (1999), 286 pp. CAN 132:280912 AN 1999:694530 CAPLUS.

-Kartal, S. N.; Dorau, B. F.; Lebow, S. T. and Grenn, III. F. (2004) **Effects of inorganic ions on leachability of wood preserving N, N-hydroxynapthalimide (NHA).** For Prod. J. 54, 80-84.

-Kartal, S. N.; Hwang, W-J.; Imamura, Y. and Sekine, Y. (2006) **Effect of essential oil compounds and plant extracts on decay and termite resistance of wood.** Holz als Roh-und Werkstroff. 64, 455-461.

-Kartal, S. N.; Imamura, Y.; Tsuchiya, F. and Ohsato, K. (2004) **Evaluation of fungicidal standard (JIS).** Japanese Standards Association. Tokyo.

-Kartal, S. Nami.; Clausen and Carol, A. (2001) **Leachability and decay resistance of particleboard made from acid extracted and bio remediated CCA-treated wood.** International Bio deterioration & Biodegradation. 47(3), 183-191.

-Kartal, S. Nami.and Lebow, Stan T. (2001) **Effect of compression wood on leaching and fixation of CCA-C treated red pine.** Wood and Fibber Science. 33(2), 182-192.

-Kazumi, O.; Noriko, S.; Kazuhiko, Y.; Genta, M. (2003) **Preparation of L-ascorbic acid-2-O-maleic acid-α-tocopherol diester 1-propanol adduct as elastase inhibitor and process for producing the same. (**Senju Pharmaceutical Co., Ltd., Japan). PCT int. Appl. 20pp.

-Keck, Juergen; Stueber, Guido J.; Kramer, and Horst E. A. (1997) **Deactivation processes of 2-hydroxyphenyl-1,3,5-triazines, polymeric and monomeric UV absorbers of the benzotriazole and triazine class** Institute Physical Chemistry, University Stuttgart, Stuttgart, Germany. Angewandte Makromolekulare Chemie, 252 119-138.

-Kerem, Z., Jensen; K.A. and Hammel, K.E. (1999) **Biodegradative mechanism of the brown rot basidomycete *Gloephyllum trabeum* : Evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction**. FEBS Letters, 446, 49-54.

-Khalil, A. (2002) **Mécanisme moléculaire de l'effet protecteur de la vitamine E dans l'athérosclérose**. Physiol. Pharmacol. 80, 662-669.

-Kim, Won-Il ; Lee, Seung-Bum; Hong, In-Kwon. (2000) **Microwave energy effect in emulsion polymerization.** Department of Chemical Engineering, Dankook University, Seoul, S. Korea. Kongop Hwahak, 11(7), 706-710. Publisher: Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry, CODEN: KOHWE9 ISSN: 1225-0112.

-Kim Y., Keunja P., Jungsoo K. and Jisoo K. (2002) **Polyoxyethylene-polyoxypropylene vitamine E and process for preparation thereof**. WO 99/62896.

-Kida, T.; Morishima, N.; Masuyama, A. Nakatsuji, Y. (1994) **New cleavable surfactants derived from glucono-1,5-lactone.** JAOCS, 71 (7).

-King, G. A. Sweeny, J. C.; Radford, T.; Iacobucci, G. A. (1980) **The ascorbic acid/oxygen degradation of anthocyanidins.** Corp. res; Dev. Dep., Coco-Cola Co., Atlanta, GA, USA. Bulletin de Liaison-Groupe Polyphenols. (9). 121-8.

-Kinzell, J. H.; Ames, N. K.; Sleight, S. D.; Krehbiel, J. D.; Kuo, C.; Zabik, M. J. and Shull, L. R. (1981) **Subchronic administration of technical pentachlorophenol to lactating dairy cattle: performance, general health, and pathologic changes.** J. Dairy Sci. 64 (1), 42-51.

-Kishida, E.; Nishimoto, Y. and Kojo, S. (1992). **Specific detremination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography.** Anal. Chem. 64, 1505-1507.

-Kiss, J.; Berg, K. P.; Dirscherl, A.; Oberhansli, W. E.; Arnold, W. (1980) **Synthese und eigenschaften von 6-desoxy-6-halogen-derivaten der l-ascorbisaure.** Helvetica Chimica Acta. 63 (6), 181.

-Kitabatake, Naofumi; Doi, Etsushiro. (1988) **Surface tension and foamability of protein and surfactant solutions.** Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ., Uji, Japan. Journal of Food Science, 53(5), 1542-5, 1569.

-Kitatsuji, Katsura; Asano, Midori; Fukase, Tetsuro. (1999) **The synergy to improve the settleability using inorganic powder with nonionic surfactant for filamentous bulking.** Technical Development Center, Kurita Water Industries, Ltd., Japan. Kankyo Gijutsu, 28(2), 117-124.

-Kitts, D. D. (1997). **An evaluation of the multiple effects of the antioxidant vitamins.** Trends Food Sci. Technol. 8, 198-203.

-Kleszczynska, Halina; Sarapuk, Janusz; Oswiecimska, Malgorzata; Witek, Stanislaw. (2000) **Antioxidative activity of some quaternary ammonium salts incorporated into erythrocyte membranes.** Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences, 55(11/12), 976-980.

-Kobylecka, J.; Skiba, E. (1993) **Spectrophotometric analysis of solubilization of Cu(II), Zn(II), Cd(II) and Co(III) complexes with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol by using quaternary ammonium salts.** Inst. Gen. Ecol. Chem., Tech. Univ., Lodz, Pol. Chemia Analityczna (Warsaw, Poland), 38(5), 599-605.

-Koch, H.; Reck, R. and Roper, H. (1993) **Vers des détergents à base de dérivés de l'amidon?** Informations Chimie.Tensio-actifs. 347.

-Koch, H., Reck, H. and Röper, H. (1993) **Dossier tensioactifs, Une industrie sous la pression de l'écologie**. Informations chimie, n°347, 67-77.

-Komsiyska, L. and Tsakova, V. (2006) **Ascorbic acid oxidation at Nonmodified and Copper-modified Polyaniline and Polyortho-methoxyaniline coatell Electrodes.** Electroanalysis. 18 (8), 807-813.

-Korotkova, E. I, Avramchik, O. A., Kagiya, T. V., Karbainov, Y. A. and Tcherdyntseva, N. V. (2003) **Study of antioxidant properties of a water-soluble Vitamin E derivative-tocopherol monoglucoside (TMG) by differential pulse voltammetry.**

-Krafft, M. P. (2001/**2002**) **Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research.** Advanced Drug Delivery Reviews, 47(2-3), 209-228. *Lettre des sciences chimiques* (77) 11.

-Krafft, Friedrich; Wiglow, H. (1895) **Behaviour of the alkali salts of the fatty acids and of soaps in presence of water.** Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 28 2566-73, 2573-82. *Chem. Berichte*, **28**, 2566.

-Kringstad, Hans. (1972) **Occurrence of phenolic carboxylic acids in the gums and hemicelluloses of barley.** Brauwissenschaft , 25(9), 272-7.

-Labuda, J.; Buckova, M.; Heilerova, L.; Silhar, S. and Stepanek, I. (2003) **Evaluation of the redox properties and anti/pro-oxidant effects of selected flovonoids by means of a DNA-based electrochemical biosensor.** Anal Bioanal Chem. 376, 168-173.

-Lahiry, A. K. (1998) **CCA treatability and leachability of muli bamboo [Melocanna baccifera (Roxb.) Kurz] grown in Bangladesh.** J. Sci. & Industrial Research, 57(1), 31-35.

-Lahiry, A. K. (1998) **CCA leachability of slow dried three major bamboo species of Bangladesh.** Bulletin of Materials Science, 21(2), 181-184.

-Lahiry, A. K. (1998) **Decay patterns of CCB treated Eucalyptus camaldulensis Dehn and CCA treated Heritiera fomes Buch.-Ham poles.** Journal of Scientific & Industrial Research , 57(4), 211-214.

-Lange, K. Robert. (1999) **Industrial applications for surfactants.** Surfactants, 144-170.

-Larpent, C. (1995) **Tensioactifs.** Techniques de l'ingénieur, traités constants physic-chimiques. Doc K 342-11.

-Laughlin, R. G.; Munyon, R. L.; Ries, S. K.; Wert, V. F. (**1981**/1983) **Growth enhancement of plants by femtomole doses of colloidally dispersed triacontanol.** Science (Washington, DC, United States), 219(4589), 1219-21.

-Law, K. Y.; Tarnawskyi, I. W.; Salamida, D.; Debies, T. (1996). **Mechanisms of charge generation and charge transfer in polymer powders.** Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry), 37(1), 105-6.

-Lebow, S. T. (1996) **Leaching of wood preservative components and their mobility in the environment.** Summary of pertinent literature. Gen. Tech. Rpt. FPL-GTR-93, U.S. Dept. Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison.

-Lebow, S.T.; Morrell, J. J. (1994) **ACZA fixation: the roles of copper and zinc in arsenic precipitation.** Proceedings-Annual Meeting of the American Wood-Preservars's Association. 89, 133-146.

-Lee, Hye Sun. (1983) **Relationship between fiber characteristics and deposition of particulate soil onto various fabrics in surfactant solutions.** Jeju Univ., Jeju, S. Korea. Nonmunjip - Cheju Taehakkyo, Chayon Kwahakpyon, 16 221-6.

-Lee S-B.; Nam, K-C.; Lee, S-J.; Lee, J-H.; Inouye, K. and Park, K-H. (2004) **Antioxidative effects of glycosyl-ascorbic acids synthesized by maltogenic amylase to reduce lipid oxidation and volatiles production in cooked chicken meat.** Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(1), 36-43.

-Le Perchec, P. (1994) **Les molécules de la beauté, de l'hygiène et de la protection**. Dossiers documentaires, CNRS Editions, NATHAN.

-Leonowicz, Andrzej.; Luterek, Jolanta.; Wasilewska, Maria W.; Matuszewska, Anna.; Hofrichter, M.; Ziegenhagen, D.; Rogalski, Jerzy.; Cho, Nam-Seok. (1999) **The role of fungal laccase in biodegradation of lignin.** Polpu, Chongi Gisul, 31(5), 1-11.

-Liao, M. L.; Seib, P. A. (1988) **Chemistry of L-ascorbic acid related to foods.** Dep. Grain Sci. Ind ; Kansas state Univ., Manhattan, KS, USA. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 30(4), 289-312.

-Liao, M. L.; Seib, P. A. (1990) **A satble form of vitamin c : L-ascorbate 2-triphosphate. Synthesis, isolation, and properties.** Dep. Grain Sci. Ind; Kansas state Univ., Manhattan, KS, USA. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38(2), 355-66.

-Li, B.; Nagalla, S. R.; Cremata, J.; Montesino, R.; Stahlberg, J.; Divne, C.; Szabo, I. J.; Henriksson, G.; and Petterson, G. (1996) **Cloning and characterization of a cDNA encoding a cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenyme from *Phanerochaete chrysosporium.*** Appl. Environ. Microbiol. 62, 1329-1335.

-Li, J-H. (2004) **Prevention of discoloration and odor generation of L-ascorbic acid fatty acid esters using sulfurous acids, etc., and skin preparations, cosmetics, and bath preparations.** (Nikko Chemicals Co., Ltd., Japan; Nihon surfactants Industry Co., Ltd.; Cosmo technical center Co., Ltd.) jpn. Kokai Tokkyo Koho. 9pp. JP 2004331524.

-Lodovici, M.; Guglielmi, F.; Casalini, C.; Meoni, M.; Cheynier, V. and Dolara, P. (2001). **Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine**. European Journal of Nutrition, 40 (2), 74-77.

-Loferski, J.R. (1999/2001) **Technologies for wood preservation in historic preservation.** Archives and Museum Informatics. 13, 273-290.

-Loke, W. M.; Proudfoot, J.M.; Mckinley, A. J. and Croft, K. D. (2006) **Augmentation of monocyte intracellar ascorbate in vitro protects cells from oxidative damage and inflammatory responses.** Biochemical and Biophysical Research communication. 345, 1039-1043.

-Lo Nostro, P. Capuzzi, G. Romani, A. Mulinacci, N. (2000) **Self-Assembly and Antioxidant Properties of Octanoyl-6-O-ascorbic Acid.**Langmuir, **16**, 1744-1750.

-Lo Nostro, P. Capuzzi, G. Pinelli, P. Mulinacci, N. Romani, A. Vincieri, F.F. (2000) **Self-assembling and antioxidant activity of some vitamin C derivatives.**Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects, **167**, 83-93.

-Lopes, G. K. B.; Schulman, H. M.; Hermes-Lima, M. (1999) **Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions**. Biochimica et Biophysica Acta, 1472 (1-2), 142-152.

-Lopez, F.; Vansuyt, G.; Casse-Delbart, F. and Fourcroy, P. (1996) **Alcohols as organic solvents for the manufacture of cellulose pulps**. Physiol. Plant. 97.13-20.

-Lorinc, Andor ; (1974) **Wetting- and emulsifying power of surfactant solutions.** Lelkes-Eros, Maria. Alkalmazott-Kem. Kolor. Kut. Lab., Budapest, Hung. Kolorisztikai Ertesito, 16(11-12), 324-37.

-Lorinc, Andor; Lelkes-Eros, Maria; (1977) **Studies on the emulsifying power of surfactant solutions. III.** Deutsch-Alter, Edit. Alkalmazott-Kem. Kolorisztikai Kut. Lab., Budapest, Hung. Kolorisztikai Ertesito, 19(5), 280-6.

-Lu, P.W.; Lillard, D. W.; Seib, P. A.; Kramer, K. J. and Liang, Y.-T. (1984) **Synthesis of the 2-methyl ether of l-ascorbic acid: stability, vitamin activity, andcarbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum compared to those of the 1- and 3-methyl ethers.** J. Agric. Food. Chem. 32, 21-28.

-Mabicka, A. (2003) **Mise au point de nouvelles formulations de préservation du bois : effets de synergie entre les constituants du mélange**. DEA Sciences du Bois.

-Mabicka, A.; Dumarçay, S.; Gelhaye, E.; Gérardin. P. (2004) **Inhibition of fungal degradation of wood by 2-hydroxypyridine-*N*-oxide.** *Holzforschung*, 58, 566-568.

-Mabicka, A.; Dumarçay, S.; Rouhier, N.; Linder, M.; Jacquot, J.P.; Gérardin, P.; Gelhaye E. (2005) **Synergistic wood preservatives involving EDTA, Irganox 1076 and 2-hydroxypyridine-N-oxide.** *International Biodeterioration Biodegradation*, 55 (3) 203-211.

-Magin, R.W.; Sauer, J. D. and Quebedeaux, D. A. (1997) **Herbicidal and plant growth regulant compositions and thier use.** US Patent. 5, 700, 760.

-Malgesini, B.; Verpilio, I.; Duncan, R. and Ferruti, P. (2003) **Poly(amido-amine)s carrying primary amino groups as side substituents.** WILEY-VCH velag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Macromol. Biosci. 3, 59-66.

-Makarov, V. G.; Makarova, M. N.; Selezneva, A. I. (2005) **Study of the mechanism of antioxidant activities of vitamins and flavonoids.** Mezhregional'nyi Tsentr" Adaptogen", St. Petersburg, Russia. Voprosy Pitaniya. 74(1), 10-13.

-Marias, F.; Puiggali, J. R. and Flamant, G. (2001) **Modeling for simulation of fluidized-bed incineration process.** AIChE J. 47(6), 1438-1460.

-Martinez, A. T.; Almendros, G.; Gonzalez-Vila, F. J.; Frund, R. (1999/2005) **Solid-state spectroscopic analysis of lignins from several Austral hardwoods.** Solid State Nuclear Magnetic Resonance, 15(1), 41-48. CODEN: SSNRE4 ISSN: 0926-2040. CAN 132: 51307 AN 2000:28795.

-Martinez, A. T.; Ruiz-Duenas, F. J.; Camarero, S.; Heinfling, A.; Martinez, M. J. (1999) **Molecular description and biotechnological potential of a third ligninolytic peroxidase.** Book of Abstracts, 217th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., March 21-25, CELL-108. CODEN: 67GHA6 AN 1999:91437.

-Martini, M-C. and Seiller M. (2003) **Actifs et additifs**. Editions TEC et DOC, 2nd édition.
Masahiro N.; Murakami M.; Manabu K. and Yoshiaki S. (1995) **Storage-stable wood preservatives containing triazole compounds, polybasic acid esters, alcohols, and polyoxyalkylesne emulsifiers**. JP 073046009 A2.

-Matthess, G. (1997/1998) **Distribution and degradation behavior of plant protectants in seeping and ground water**. Schriftenreihe des Vereins fur Wasser-, Boden- und Lufthygiene , 100 I-IV, 1-439.

-May, J. M.; Qu, Z-C. and Cobb, C. E. (1996) **Accessibility and reactivity of ascorbate 6-palmitate bound to erythtocyte membrane.** Free Radical Biol Med. 21, 471-480.

-Mazor, D.; Greenberg, L.; Shamir, D.; Meyerstein, D.; Meyerstein, N. (2006) **Antioxidant properties of bucillamine : Possible mode of action.** Biochem. Biophys. Res. Co. 349 1171–1175.

-Mehlhorn, H.; Tabner, B. and Wellburn, A. R. (1990) **Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat.** Physiol. Plant. 79, 377-383.

-Mehlhorn, H.; Cottarn, D. A.; Lucas, P.W. and Well Burn, A. R. (1987) **Induction of ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities by interactions of mixtures of air pollutants**. Free Radical Res. Commun. 3, 1-5.

-Minoru, I. (1990) **Synergistic wood preservative compositions containing 1-[[2,-4-dichlorophenyl)-1H-, 2, 4-triazole derivatives**. JP 02006102 A2.

-Mitchnick, M. A. and Gwozdz, G. G. (2000) **Stabilized ascorbic acid, composition, and method of use.** (Sunsmart,Inc., USA). PCT Int. Appl. 19pp. A1 20000210.

-Mittler, R. (1991) **Oxidative stress responses in the unicellular cyanobacterium Synechococcus PCC 7942.** Free radical research communications, 12-13 Pt 2 845-50.

-Mittler, R.; and Zilinska, B. A. (1991) **Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidise**. Plant Physiol. 97, 962-968.

-Mizushima, Y.; Harauchi, T.; Yoshizaki, T. and Makino, S. (1984) **A rat mutant unable to synthesize vitamin C.** Experientia. 40, 359-361.

-Mokhtar, H.M.; El Sadek, M. M.; Zagzoug, N. B. (1994) **Synthesis and reactions of L-ascorbic acid analog 4'(4-ethoxyl-5-methylfuran-2-yl)-2,3-dioxobutyro-1,4-lactone.** Faculty of Science, Alexandria University, Egypt. Pakistan Journal of Scientific and Industrial research. 37(6-7), 221-6.

-Monks, T. J. and Jones, D.C. (2002) **The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinonethioethers.** Curr. Drug Metab. 3, 425-438.

-Mori, Y. Sakamoto, H. (1975) **Browning reaction between L-ascorbic acid and amine.** Univ., Hiroshima, Japan. Kaseigaku Zasshi. 26(7), 489-93.

-Murad, S.; Grove, D.; Lindberg, K. A.; Reynolds, G.; Silvarajah, A. and Pinnell, S. R. (1981) **Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 2879-2882.

-Naguib, Yousry M. A. (2000) **A fluorometric method for measurement of oxygen radical-scavenging activity of water-soluble antioxydants.** PhytoChem technologies, Chelmsford, MA, USA. Analytical biochemistry. 284(1), 93-98.

-Navas, P. and Gomez-Diaz, C.(1995) **Ascorbate free radical and its role in growth control.** Protoplasma. 184, 8-13.

-Neogi, P. and Munden, J. J. (2007) **Solubilization kinetics of soluble oil by an ionic surfactant.** Journal of Colloid and Interface Science. 305, 202-203.

-Ng TB,; Liu, F.; and Wang, Z. T. (2000) **Antioxidative activity of natural products from plants.** Life Sci. 66(8) 709-723.

-Nicholas, D. D.; Kadir, A.; Williams, A. D. and Preston, A. F. (2000) **Water repellency of wood treated with alkylammonium compounds and chromated copper arsenate.** International Research Group on Wood Preservation. Doc. No. IRG/WP 00-30231.

-Njus, David; Kelley, Patrick M. (1991) **Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo.** FEBS Letters, 284(2), 147-51.

-Njus, David; Jalukar, Vishram; Zu, Jian; Kelley, Patrick M. (1991) **Concerted proton-electron transfer between ascorbic acid and cytochrome b561.** American Journal of Clinical Nutrition, 54(6, Suppl.), 1179S-1183S.

-Noferi, M.; Masson, E.; Merlin, A.; Pizzi, A. and Deglise, X. (1997) **Antioxidant characteristics of hydrolyzable and polyflavonoid tannins: an ESR kinetics study**. Journal of Applied Polymer Science, 63 (4), 475-482.

-Norber, W. and Schneider, G. (1986) **Manufacture and use of polyoxyalkylene ether dialkylamine oxides as surfactants in tertiary petroleum oil recovery.** European Patent. DE 3, 501-630.

-Ohsima, H.; Kurosawa, M.; Yoshie, Y.; Auriol, S. and Gilibert, I. (1998) **Development of a new sample chamber for proton microprobe analysis of mineral samples.** Free Rad Bio Med. 25 : 1057.

-Ogata, Y. and Kosugi, Y. (1970) **Autoxidation and determination of L-ascorbic acid.** Dep. Appl. Chem.; Nagoya Univ., Nagoya, Japan. Memoirs of the faculty of Engineering, Nagoya University. 22(2), 165-95.

-Okada, Tatsumi. (1969) **Application of surfactants in the pulp and paper industry.** Yukagaku, 18(7), 391-8. CODEN: YKGKAM ISSN: 0513-398X. CAN 71: 103301 AN 1969:503301.

-Okamura, H.; Mimura, A.; Yakou, Y.; Niwano, M. and Takahara, Y. (2001) **Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata***. Biotechnology Research Laboratory, 33(3), 557-561.

-Olson, D. (1998) **Use of amine oxide surfactants for chemical flooding enhanced oil recovery.** NTIS Report No. NIPER-417.

-Ortial, Stephanie; Durand, Gregory; Poeggeler, Burkhard; Polidori, Ange; Pappolla, Miguel A.; Boeker, Jutta; Hardeland, Ruediger; Pucci, Bernard. (2006) **Fluorinated Amphiphilic Amino Acid Derivatives as Antioxidant Carriers: A New Class of Protective Agents.** Journal of Medicinal Chemistry, 49(9), 2812-2820.

-Palma, S.; Lo Nostro, P.; Manzo, R. and Allemandi D. (2002) **Evaluation of the surfactant properties of ascorbyl palmitate sodium salt.** Eu. J. Pharmaceutical Sciences 16, 37-43.

-Palestis, B. G.; Trivers, R.; Burt A.; Jones, R. N. (2004) **The distribution of B chromosomes across species**. Cytogenetic and genome research, 106(2-4), 151-8. Journal code: 101142708. E-ISSN:1424-859X. PubMed ID 15292585 AN 2004387767.

-Palmer, A. S.; Stewart, J. Fyfe, L. (2001) **The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese.** Int. J. Food Microbial. 18, 463-470.

-Park, S.; Viklund, F.; Hult, K.; Kazlauskas, R. J. (2003) **Vacuum-driven lipase-catalysed direct condensation of l-ascorbic acid and fatty acids in ionic liquids: synthesis of a natural surface active antioxidant.** Royal institute of technology, department of biotechnology, AlbaNova Univ. center, Stockholm, Swed. Green chemistry. 5(6), 715-719.

-Pauquet, J. R. (1999) **Breakthrough chemistry for processing stabilization of polypropylene.** J. Macromol. Science, Pure and Applied Chemistry, A36 (11), 1717-1730.

-Pavlinova, R. M.; Nikolaeva, N. S.; Tuleuova, E. T. (1968) **Organotin antiseptic compositions.** U.S.S.R. CODEN: URXXAF SU 220389 19680628.

-Pedersen, C.; Bock, K. and Lundt, I. (1978) **Synthesis of bromodeoxy sugars from hexoses, alditols, and aldonic acids.** Pur & Appl. Chem. 50, 1385-1400.

-Perreux, L.; Loupy, A. and Volatron, F. (2002) **Solvent-free preparation of amides from acids and primary amines under microwave irradiation.** Tetrahedron; 58, 2155-2162.

-Pessina, F.; Marazova, K.; Ninfali, P.; Avanzi, L.; Manfredini, S. and Sgaragli, G. (2004) **In vitro neuroprotection by novel antioxidants in guinea-pig urinary bladder subjected to anoxia-glucopenia/reperfusion damage.** Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 370, 521-528.

-Peterkofsky, B. (1972) **The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts.** Arch Biochem Biophys. 152, 318-328.

-Petrova, E. G.; Borisenkova, S. A. and Kaliya, O. L. (2004) **Oxidation of ascorbic acid in the presence of phthalocyanine metal complexes. Chemical aspects of catalytic therapy of cancer. 2 Catalysis by cobalt octacarboxyphthalocyanine. Reaction products.** Russian chemical bulletin, International Edition, 53 (10), 2322-2326.

-Pezron, I.; Bourgain, G.; Clausse, D. (1996) **Influence of 1-decanol on the surface tension and wetting power of a new anionic surfactant derived from sugar.** Dep. Genie Chimique, Univ. Technologie Compiegne, Compiegne, Fr. Colloid and Polymer Science, 274(2),166-71.

-Pietta, P. G. (2000) **Flavonoids as antioxidants**. J. Nat. Prod. 63(7) ; 1035-1042.

-Pinter, J., Agnes R., Anna S. and Tibor V. (1993) **Waterborne preservative coatings for wood**. HU 61922 A2.

-Pizzi, A.; Conradie, W. E.; Jansen, A. (1984) **Sludge formation in timber treatment with CCA preservatives-origin and elimination.** Spec. Rep.-Natl. Timber Res. Inst. C. S. I. R. (HOUT 332), 27pp. CAN 104: 90717 AN 1986: 90717.

-Pizzi, A.; Simon, C.; George, B.; Perrin, D. and Triboulot, M. C. (2004) **Tannin antioxidant characteristics in leather versus leather light stability : Models**. Journal of Applied Polymer Science, 91(2), 1030-1040.

-Pradip.; Rai, Beena. (2002) **Design of tailor-made surfactants for industrial applications using a molecular modeling approach.** Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, 205(1-2), 139-148.

-Puppo, A. and Davies M. J. (1992) **Direct detection of a globin-derived radical in leghaemoglobin treated with peroxides**. Phytochemistry. 31: 85.

-Racchi, M.; Daglia, M.; Lanni, C.; Papetti, A.; Govoni, S. and Gazzani, G. (2002) **Antiradical activity of water soluble components in common diet vegetables.** J. Agric. Food Chem. 50, 1272-1277.

-Raices, M.; Paifer, E.; Cremata, J.; Montesino, R.; Stahlberg, J.; Divne, C.; Szabo, I.J.; Henriksson, G.; and Petterson, G. (1995) **Cloning and characterization of a cDNA encoding a cellobiose dehydrogenase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.** FEBS Lett. 369, 233-238.

-Raoof, J. B.; Ghafourian, H.; Ojani, R and Kiani, A. (2001) **Destruction of aflatoxin and fungi decontamination study by ultraviolet and microwave irradiation.** J. Electroanal. Chem. 515, 45.

-Ravey, Jean Claude; Stebe, Marie Jose. (1987/1988) **Structures and solubilization properties of fluorinated nonionic surfactants.** Comunicaciones presentadas a la Jornadas del Comite Espanol de la Detergencia, 18 271-89 or Colloid. Polym. Sci., 76, 234-241.

-Reimer, G. (1992) **Wood preservative émulsions concentrate**. DE 4112652 A1.

-Rico-lattes, Isabelle. (2007) **Water, surfactants and sugars: ingredients for new bioactive organized molecular systems and medicines.** Actualité Chimique n°305 février 2007.

-Rico-Lattes, I. and Lattes A. (1994) **Les tensioactifs, éléments clés des systèmes moléculaires organisés plurimoléculaires.** Images de la recherche. n°2,107-112.

-Riess, Jean G. (2002) **Fluorous micro- and nanophases with a biomedical perspective.** Tetrahedron, 58(20), 4113-4131.

-Riess, Jean G. (2002) **Blood substitutes and other potential biomedical applications of fluorinated colloids.** Journal of Fluorine Chemistry, 114(2), 119-126.

-Riess, Jean G. (2001) **Oxygen Carriers ("Blood Substitutes")-Raison d'Etre, Chemistry, and Some Physiology.** Chemical Reviews (Washington, D. C.), 101(9), 2797-2919.

-Rigano, L.; Cavalletti, T.; Benetti, S.; Traniello, S. (1995) **Evaluation of predictable irritative power of surfactant mixtures by human fibroblast culture and its correlation to physico-chemical parameters.** Laboratorio di Ricerca Cosmetica L. Rigano, Milan, Italy. International Journal of Cosmetic Science, 17(1), 27-43

-Roberts, W.G. and Gordon, M. H. (2003) **Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay.** J. Agric. Food Chem. 51, 1486-1493.

-Rodriguez, E.; Nuero, O.; Guillen, F.; Martinez, A. T.; Martinez, M. J. (2004) **Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four Pleurotus species: the role of laccase and versatile peroxidase.** Soil Biology & Biochemistry, 36(6), 909-916.

-Roe, J. H. and Kuether, C. A. (1943) **The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid.** J. Biol. Chem. 147, 399-407.

-Roginsky, V. A.; Barsukova, T. K.; Bruchelt, G. and Stergmann, H. B. (1998) **Kinetics of redox interaction between substituted 1,4-benzoquinones and ascorbate under aerobic conditions: Critical phenomena.** Free Radic. Res. 29, 115-125.

-Rosales, M. A.; Ruiz, J. M.; Hernandez, J.; Soriano, T.; Castilla, N. and Romero, L. (2006) **Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar radiation.** J.Sci Food Agric. 86, 1545-1551.

-Ros-Barcelo, A; Gomez-Ros, L. V.; Ferrer, M. A. and Hernandez, J. A. (2006) **The apoplastic antioxidant enzymatic system in the wood-ferming tissues of trees**. Original article, Trees, 20,145-156.

-Rosenblat, G.; Willey, A.; Zhu, Y.N.; Janas, A.; Diegelmann, R. F. Neeman, I. and Graham, M. F. (1999). **Palmitoyl ascorbate: Selective augmentation of procollagen mRNA expression compared with L-ascorbate in human intestinal smooth muscle cells.** Journal of Cellular Biochemistry. 73, 312-320.

-Roubroeks, Saake, Glasser and Gatenholm. (2004) **Contribution of the molecular architecture of 4-*O*-methyl glucuronoxylan to its aggregation behavior in solution.** ACS Symp. Ser. 864, 167.

-Rowell, Roger M. (2005) **Chemical Modification of Wood.** Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites. Taylor & Francis. ISBN 0-8493-1588-3. 381-420.

-Rowell, R.M., Pettersen R., Han J.S., Rowell J.F., Tshbalalab M. A. (2005) **Cell Wall Chemistry**. Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites. RC Press.Taylor & Francis. 35-74.

-Ruda, T. A and Dutta, P. K. (2005) **Fenton Chemistry of FeIII exchanged zeolitic minerals treated with antioxidants.** Environ. Sci. Technol. 39, 6147-6152.

-Rumpf, P. and Marlier, S. (1958) **Note sur la synthése de l'acide ascorbique.** Centre d'études et de recherches de chimie organique appliquée, C.N.R.S. 41.

-Ruso, Juan M.; Taboada, Pablo; Attwood, David; Mosquera, Victor; Sarmiento, Felix. (2000) **Determination of the aggregation properties of weakly self-associating systems by NMR techniques : the self-association of propranolol hydrochloride in aqueous electrolyte solution.** Physical Chemistry Chemical Physics, 2(6), 1261-1265.

-Sabzi, R. E.; Pournaghi-Azar, M. H. (2001/2004) **Electrocatalytic determination of ascorbic acid on a glassy carbon electrode chemically modified with cobalt pentacyanonitrosylferrate.** Analytical Sciences. 21.

-Salghi, A. (2006) **Spectroscopie d'absorption ultraviolette et visible.** Analyses physicochimiques II. Cours d'analyses physico-chimique des denrées alimentaires, GPEE, 1ére année.

-Sanchez-Leal, J.; Comelles, F.; Gonzalez, J. (2001) **Is there any correlation between surface tension and wetting power for surfactant solutions?** Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, 78(11), 597-600.

-Saparrat Mario, C N; Guillen Francisco; Arambarri Angelica M; Martinez Angel T; Martinez Maria Jesus (2002) **Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete Coriolopsis rigida**. Applied and environmental microbiology, 68(4), 1534-40. Journal code: 7605801.

-Saparrat Mario, Carlos Nazareno; Martinez Maria Jesus; Cabello Marta Noemi; Arambarri Angelica Margarita. (2002) **Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata**. Revista iberoamericana de micologia : organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micologia, 19(3), 181-5. Journal code: 9425531. ISSN:1130-1406. PubMed ID 12826000 AN 2003299645.

-Sarapuk, J.; Kleszczynska H.; Radecka H. and Oswiecimska M. (2000) **Potential pesticide efficiency of new bifunctionnal surfactants**. Cellular and molecular Biology Letters, 5(3), 349-356.

-Savostianof, D. (1988) **Tensioactifs : des auxiliaires indispensables**. Informations Chimie, n°293, 135-151.

-Scaiano, J. C.; Netto-Ferreira, J. C.; Wintgens, Veronique. (1991) **Fragmentation of ketyl radicals derived from α -phenoxyacetophenone: an important mode of decay for lignin-related radicals?** Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry, 59(2), 265-8.

-Scaiano, J. C. (1991) **Kinetic studies of the behavior of free radicals on organized systems: from micelles to zeolites.** Atual. Fis.-Quim. Org., [Conf. Latinoam. Fis.-Quim. Org.], 1st , 41-57.

-Scandalios, J. G. (1990) **Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress**. Adv. Genet. 28, 1-41.

-Schaller, Christian; Rogez, Daniel. (2006) **Defended from the sun : optimised use of UV absorbers and HALS in the weathering protection of wood substrates.** European Coatings Journal, (12), 22, 24-27.

-Schaller, Christian; Rogez, Daniel; Gross, Thomas. (2007) **New concepts of light stabilization for parquet flooring.** Pitture e Vernici, European Coatings, 83(1), 17-28.

-Schaller, Christian; Rogez, Daniel. (2007) **New approaches in wood coating stabilization.** Journal of Coatings Technology and Research, 4(4), 401-409. CODEN: JCTRCP AN 2007.

-Schick, M.J. (1966) (ed), **Nonionic Surfactants, Surfactant Science Series**, vol 1, M.Dekker Inc, New York.

-Shimada, Akihiko; Takeuchi, Motomu; Ujihara, Masaki. (1997/1998) **Storage-stable and nonirritant shampoos and skin-cleansing compositions containing anionic surfactants.** Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 15 pp.

-Schmidt, John A.; Heitner, Cyril. **Light-induced yellowing of mechanical and ultra-high yield pulps. Part 3. Comparison of softwood TMP, softwood CTMP and aspen CTMP.** Journal of Wood Chemistry and Technology (1995), 15(2), 223-45.

-Schmidt, John A.; Heitner, Cyril. (1993) **Use of UV-visible diffuse reflectance spectroscopy for chromophore research on wood fibers : a review.** Tappi Journal, 76(2), 117-23.

-Schmidt, John A.; Heitner, Cyril. (1993) **Light-induced yellowing of mechanical and ultrahigh yield pulps. Part 2. Radical-induced cleavage of etherified guaiacylglycerol-β -aryl ether groups is the main degradative pathway.** Journal of Wood Chemistry and Technology, 13(3), 309-25.

-Schmidt, J. A.; Goldszmidt, E.; Heitner, Cyril; Scaiano, J. C.; Berinstain, A. B.; Johnston, L. J. (1993) **Photodegradation of α-guaiacoxyacetoveratrone. Triplet-state reactivity induced by protic solvents.** ACS Symposium Series, 531(Photochemistry of Lignocellulosic Materials), 122-8.

-Schmidt, John A.; Heitner, Cyril. (1995) **Light-induced yellowing of mechanical and ultra-high yield pulps. Part 3. Comparison of softwood TMP, softwood CTMP and aspen CTMP.** Journal of Wood Chemistry and Technology, 15(2), 223-45.

-Schmidt, G.; Kunert, G. H. (1986) **Role of oxygen in brewing beer**. Plant Physiol. 82, 700-703.

-Schnefer, D. M.; Lui, Q.; Faustman, C.; Yin, M-C. (1995) **Supranutritional administration of vitamins E and C improves oxidative stability of beef.** J. Nutr. 125, 1792S-1798S.

-Schneider, G., Thiem J.; Lahman M. (1996) **Tocophherylglycoside, ihre herstellung sowie ihre verwendung als tenside, als antioxidantien sowie als der zellalterung vorbeugender wirkstoff in cosmetischen oder pharmazutischen zubereitungen**. EP 0 726 273 A1.

-Schrihatti, V. R.; Nair, P. M. (1977) **Preparation and properties of 3-methyl and 2,3-dimethyl ethers of ascorbic acid.** Natl. Chem. Lab., Poona, India. Indian Journal of Chemistry, section B. organic chemistry including medicinal chemistry. 15B (9), 861-3.

-Schultz, T. P.; Harms, W. B.; Fisher, T. H.; McMurtrey, K. D.; Minn, J.; Nicholas, D. D. (1995) **Durability of angiosperm heatwood : the important of extratractives.** Holzforschung. 49, 29-34.

-Schultz, T.; Nicholas D. (2002) **Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators.** Phytochemistry. 61; 555-560.

-Schwartz, M. Baumstark, R. (2001) **Water-based acrylates for decorative coatings.** Vincentz-Verlag, Hannover. Chapter, 5, p 191ff.

-Schweikert, L. Sambale, C. (1993) **Use of fatty acid esters of ascorbic acid as emulsifier for preparation of stable, fluid preparations of fat-soluble substances.** (BASF A.-G., Germany). Ger. Offen. 4pp. DE 4200728.

-Schwetlick, K.; Habicher, W. (2002) **Antioxidant action mechanisms of hindered amine stabilisers**. Polymer Degradation and Stability, 78; 35-40.

-Scott, A.; Vojvodic, P. R.; Anderson, N. H.; Clark, B. J. (1993) **Enantiomeric separation of ciprofibrate and analogs using a cellulose-based chiral stationary phase.** Analytical Proceedings, 30(9), 365-6. CODEN: ANPRDI ISSN: 0144-557X. CAN 120:22822.

-Seib, P. A.; Liang, Y.-T.; Lee, C.-H.; Hoseney, R. C.; Deyoe, C. W. (1974) **Synthesis and stability of L-ascorbate 2-sulfate.** Dep. Grain Sci., Kansas State University Research Foundation, Manhattan, KS, USA). Journal of chemical society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry (1972-1999). 11, 1220-4.

-Seib, P. A.; Cousins, R. C.; Hoseney, Russell, C. (1978) **Fatty acid esters of ascorbiqc acid.** (Kansas State University Research Foundation, USA). Ger. Offen. 29pp. DE 77-2743526.

-Seib, P. A.; Liao, M. L. (1987) **Ascorbate 2-polyphosphate esters and method of making same.** (Kansas State University Research Foundation, USA). PCT Int. Appl. 39pp. A 19870115.

-Seib, P. A.; Wang, X. Y. (1992) **Method of preparing 2-phosphorylated compounds of ascorbic acid.** (Kansas State University Research Foundation, USA). U.S. 6pp. A 199205005.

-Seib, P. A. Tolbert, B. M. (1982) **Eds. Ascorbic acid: Chemistry, Metabolism, and Uses.** American Chemical Society: Washington. DC.

-Sestili, P.; Guidarelli, A.; Dacha, M. Cantoni, O. (1998) **Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism**. Free Rad Biol Med. 25(2) 196-200.

-Shah, V. and Nerud, F. (2002) **Lignin degrading system of white rot fungi and its exploitation for dye decolorization.** Can. J. microbiol. 48.

-Shanks, D.; Al-Maharik, N.; Malmstrom, J.; Engman, L.; Eriksson, P.; Stenberg, B. Reitberger,T. (2003) **Improved antioxidant formulations for polymeric materials synergistic protective effects in combinations of organotellurium compounds with conventional phenolic antioxidants or thiols.** Pol. Degradation and Stability.81, 261-271.

-Shao, Y.-Y.; Seib, P. A.; Kramer, K. J.; Van Galen, D. A. (1993) **Synthesis and properties of D-erythroascorbic acid and its vitamin C activity in the tobacco hornworm (*Manduca sexta*).** J. Agric. Food. Chem. 41, 1391-1396.

-Shilov, B.; Battalova, R. M.; Denisev, E. T. (1972) **Regeneration of iminoxyl radical during polypropylene oxydation**. 207(2) ; 338-9.

-Silva, G.M., Maja Campos, P.M. (2000) Ascorbic acid and its derivatives in cosmetic formulations. Cosmet. Toil. 115, 59–62.

-Silvestre, M. P. C.; Chaiyasit W.; Brannan R. G.; McClements D. J. Decker E. A. (2000) **Ability of surfactant headgroup size to alter lipid and antioxidant oxidation in oil-in-water emulsions**. J. Agric. Food. Chem. 48, 2057-2061.

-Simpson Strong-Tie. (2006) **Préservation des bois de construction**. Bulletin Technique. Zac des chemins 85400 Sainte Gemme la plaine. France.

-Sisneros, J. A.; Nelson, D.R. (2001) **Surfactants as chemical shark repellents: past, present, and future.** Environmental Biology of Fishes. 60, 117-129.

-Skiera, I.; Paryzek, Z.; Zakl. (2004) **Cleavage reactions of lactones- application in organic synthesis.** Chem. Bioorg., Wydz. Chem., Uniw. Im. Adama mickiewicza, Poznan, Pol. Wiadomosci Chemiczne. 58(11-12), 845-879.

-Skrylev, L. D.; Soldatkina, L. M.; Strel'tsova, E. A.; Skryleva, T. L. (1992) **Adsorption-micellar energy ratio of surfactants as a criterion of their cleaning power on a petroleum-contaminated metal surface.** Odess. Gos. Univ., Odessa, Ukraine. Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii, Khimiya i Khimicheskaya Tekhnologiya, 35(8), 102-4.

-Smith, A J; Wells J W (1978) **The source of androgenic activity in the African wood Funtumia latifolia: a steroid hormone formed by the action of Fusarium solani**. Journal of the science of food and agriculture, 29(9), 783-7. Journal code: 0376334.

-Smith, R. L.; Cohen, S. M.; Doull, J.; Feron, V. J.; Goodman, J. I.; Marnett, I. J.; Portoghese, P. S.; Waddell, W. J.; Wagner, B. M.; Hall, R. I.; Higley, N. A.; Lucas-Gavin, C.; Adams, T. B. (2005) **A procedients in food: essential oils.** Food Chem Toxicol. 43, 345-363.

-Smith, R.W., (1988) in Reagents in mineral technology, Somasundaran P., Moudgil B.M., Ed, Marcel Dekker, New York, 219.

-Smythies, J.; De Iuliis A.; Zanatta, L.; Galzigna, L. (2002) **The biochemical basis of Parkinson's disease: the role of catecholamine o-quinones: a review-discussion**. Neurotox. Res. 4, 77-81.

-Sobisch, T. (1994) **Solubilization in aqueous solutions of surfactant mixtures.** Berlin, Germany. Tenside, Surfactants, Detergents, 31(1), 36-8.

-Starnes, W.H., Jr. (1999) **Some antioxidant chemistry revisited.** Chemistry and Technology of Polymer Additives, 62-70.

-Step, E. N.; Turro, N. J.; Gande, M. E.; Klemchuk, P. P. (1993) **Mechanism of polymer stabilization by hindered-amine light stabilizers (HALS). Model investigations of the Interaction of peroxy radicals with HALS amines and aminoethers.** Polmer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry). 34(2), 231-232.

-Step, E. N.; Turro, N. J.; Gande, M. E.; Klemchuk, P. P. (1994) **Mechanism of Polymer Stabilization by Hindered-Amine Light Stabilizers (HALS). Model Investigations of the Interaction of Peroxy Radicals with HALS Amines and Amino Ethers.** 27(9), 2529-39.

-Stites, T. E.; Mitchell, A. E.; Rucker, R. B. (2000) **Physiological importance of quinoenzymes and the O-quinone family of cofactors.** J. Nutr. 130, 719-727.

-Svoboda, B.; Nina, S.; Jaroslav, H.; Jaromir, K. (1981) **Water-soluble emulsion painting composition**. CS 190263 B.

-Szymula, M.; Narkiewicz-Michalek, J. (2003) **Atmospheric and electrochemical oxidation of ascorbic acid in anionic, nonionic and cationic surfactant systems.** Colloid Polym Sci 281, 142-1148.

-Tadros, T. F. (1991) **Some industrial applications of surfactants.** Lecture Notes in Physics, 386 (Capillarity Today), 349-60.

-Tajima, S.; Pinnell, R. S. (1982) **Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid: ascorbic acid increases Type I procollagen mRNA.** Bioch. B. Res. Com. 106, 632-637.

-Takafumi, I. (1995) **Dimensional stabilization of woods treated with the condensed-ring compounds made from glyoxal, urea and formaldehyde (glyoxal resins). V. Dimensional stabilities and hygroscopicities of woods treated with mixtures of glyoxal resins and polyhydric alcohols**. Mokuzai Kogyo, 50(10), 455-459.

-Takahama, U. (1993) **Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid : Different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from Epicotyls of *Vigna angularis***. Plant Cell physiol.; 34. 809-817.

-Takahama, U.; Oniki, T. (1994) **Effects of ascorbate on the oxidation of derivatives of hydroxycinnamic acid and the mechanism of oxidation of sinapic acid by cell wall-bound peroxidases.** Plan. Cell. Physiol. 35, 593-600.

-Takahana, U. (1994) **Changes Induced by abscisic acid and light in the redox state of ascorbate in the apoplast of Epicotyls of *vigna angularis.*** Plant Cell Physiol. 35. 975-978.

-Takahiko, M.; Masaru, Y.; Shuzo, S. (1993) **Preparation of higher purity 2-O-α-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by oxidation of ascorbic acid saccharides.** (kabushiki kaisha hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo, Japan). Eur. Pat. Appl. 12pp. EP 539196.

-Takanaga, H.; Mackenzie, B. (2003) **Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23.** Pflugers arch-Eur, J. Physiol. 447, 677-682.

-Takeda. (1984) **Purification of L-ascorbic acid 2-phosphate ester.** Chemical industries, Ltd., Japan. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. 5pp JP 59036539.

-Takeda, T.; Yoshimura, K.; Yoshii, M.; Kanahoshi, H.; Miyasaka, H. and Shigeoka. S. (1999) **Molecular Characterization and physiological role of ascorbate peroxidase from halotolerant *chlamydomonas sp* W80 strain.** Archi. bioch. biophy. 376 (1), 82-90.

-Tanaka, H.; Fuse, G.; and Enoki, A. (1991) **An extracellular H2O2-producing and H2O2-reducing glycopeptide preparation from the lignin-degrading white-rot fungus. *Irpex Lacteus***. Mokuzai Gakkaishi. 37, 386-988.

-Tanaka, H.; Hirano, T.; and Enoki, A. (1993) **Extracellar substance from the white-rot basidiomycete *Irpex lacteus* for the production and reduction of H2O2 during wood degradation.** Mokuzai Gakkaishi. 39, 493-499.

-Tanaka, H.; Itakura, S.; Hirano, T. and Enoki, A. (1996) **An extracellular substance from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* for reducing molecular oxygen and ferric iron.** Holzforschung. 50, 541-548.

-Tanaka, K.; Suda, Y.; Kondo, N. and Sugahara, K. (1985) **Cyclic sinus node dysfunction in a patient with hyperthyroidism**.Plant Cell. Physiol. 26, 1425-1431.

-Thevenon, M.-F.; Pizzi A. (2003) **Polyborate ions' influence on the durability of wood treated with non-toxic protein borate preservatives.** Holz als Roh - und Werkstoff, 61 (6), 457-464.

-Tanjore, S.; Viraragnavan, T. (1997) **Effect of oxygen on the adsorption of pentachlorophenol by peat from water.** Water, Air, and Soil Pollution. 100, 151-162.

-Thomsen, B. Drumm-Herrel, H and Mohr, H. (1992) **Control of the appearance of ascorbate peroxidise (EC, 1.11.1.11) in mustard seedling cotyledons by phytochrome and photooxidative treatments.** Planta, 186 (4), 600-608.

-Tolbert, B. M.; Downing, M.; Carlson, R. W.; Knight, M. K.; Baker, E. M. (1975) **Chemistry and metabolism of ascorbic acid and ascorbate sulfate.** Dep. Chem., Univ. Colorado, Boulder, CO, USA. Annals of the New York Academy of Sciences. 258 (Conf. Vitam. C. 2nd, 1974), 48-69.

-Tolstaya, S. N.; Shabanova, S. A. (1976) **Use of Surfactants in the Paint and Varnish Industry.** 176 pp. CAN 87: 54594 AN 1977: 454594.

-Tomiko, S.; Sakari, N. (1970) **Determination of the enzyme activity of L-ascorbic acid oxidase.** Hokkaido Univ. Educ., Hakodate, Japan. Hokkaido kyoiku Daigaku kiyo, Dai-2-bu, a: Sugaku, Butsuri. Kogaku Hen, 71-5.

-Toussaint-Dauvergne, E.; Souloungangа, P.; Gérardin P. and Loubinoux, B. (2000) **Glycerol/Glyoxal: a new boron fixation system for wood preservation and dimensional stabilization.** Holzforschung, 54(2), 123-126.

-Turkova, J. (1959) **Stabilization of ascorbic acid by thiamine.** Cesko-slovenska Farmacie. 8, 6-9.

-Udaya, N.; Freidoon S. (2003) **Stabilization of canola oil with flavonoids.** Food Chemistry, 50, 393-396.

-Uehleke, H. (1962) **Relations between structure, velocity of biological N-hydroxylation, and toxicity of aromatic amines**. Proc. Intern. Pharmacol. Meeting, 1st, Stockholm, 1961, 6, 31-7.

-Vaution, Catherine; Treiner, Claude. (**1983**/1985) **Contribution to the investigation of micellar solubilization - specific case of surfactant mixtures.** S.T.P. Pharma, *Les systèmes dispersés*, Lavoisier (5) 4. (4), 333-40.

-Velisek, J.; Davidek, J.; El-zeany, B.; Pokorny, J. Janicek, G. (1974) **Antioxidant activity of some brown pigments in L-ascorbic solutions.** Dep. Food Chem., Prague Inst. Chem. Technol., Prague, Czech. Zeitschrift fue lebensmittel-Untersuchung und-forchung. 154-6.

-Vogler, E A. (1998) **Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces**. Advances in colloid and interface science, 74 69-117. Journal code: 8706645.

-Vogler, E A; Nadeau J. G; Graper J. C. (1998) **Contact activation of the plasma coagulation cascade. III. Biophysical aspects of thrombin-binding anticoagulants**. Journal of biomedical materials research, 40(1), 92-103. Journal code: 0112726.

-Vogler, E A; Graper J C; Sugg H W; Lander L M; Brittain W J. (1995) **Contact activation of the plasma coagulation cascade. II. Protein adsorption to procoagulant surfaces**. Journal of biomedical materials research, 29(8), 1017-28. Journal code: 0112726. ISSN: 0021-9304.

-Vogler, E A; Graper J C; Harper G R; Sugg H W; Lander L M; Brittain W J. (1995) **Contact activation of the plasma coagulation cascade. I. Procoagulant surface chemistry and energy**. Journal of biomedical materials research, 29(8), 1005-16. Journal code: 0112726. ISSN:0021-9304. PubMed ID 7593031 AN 96082856.

-Walker, L. (1998) **Waterproofing and preservative compositions for wood.** US Patent. 5, 833-741.

-Walker, L. (1994) **Alkylammonium compounds as wood preservative in procceding of "wood preservation in the 90s and beyond,"** Proceedings No. 7308 published by the Forest Products Society. 220-228.

-Wang, He; Han, Xiaori; Yu, Chengguang; Wang, Yeqing; Ma, Lingling. (2006) **Antifoaming study on copolymer starch- PVA coated material.** Zhongguo Turang Yu Feiliao, (3), 31-34. CODEN: ZTYFAZ ISSN : 1673-6257. CAN 148: 191151 AN 2007:738435.

-Wang, Hongmin; Tian, Cui; Yu, Jingfeng; Liu, Fengqi. (2007) **Emulsion polymerization of styrene using SMA-g-MPEG as surfactant.** Abstracts of Papers, 234th ACS National Meeting, Boston, MA, United States, August 19-23, 2007, POLY-174.

-Wang, Pao-Chi; (1975) **Role of surfactant micelles in emulsion polymerization.** Piirma, Irja. Inst. Polym. Sci., Univ. Akron, Akron, OH, USA. Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry), 16(1), 114-19.

-Wang, X.; Qian, W.-W.; Seib, P. A. (1995) **An improved synthesis of L-ascorbate 2-polyphosphate.** Department of grain Science, Kansas State university, Manhattan, KS, USA. Journal of Carbohydrate Chemistry. 14(1), 53-77.

-Wardman, P. (2001) **Electron transfer and oxidative stress as key factors in the design of drugs selectively active in hyponia.** Curr. Med. Chem. 8, 739-761.

-Wassermann, Hubert, Elmostafa Azim, Gérard Coudert, Samuel Achilefu and Claude Selve**, (**1992) **Symmetric di- or tetra-alkyl substituted monodisperse polyoxyethyleneglycols : synthesis and surface properties,** *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2043 – 2047**.**

-Washko, P.W.; Welch, R. W.; Kuldeep, R. D.; Wang, Y.; Levine, M. (1992) **Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples.** Anal. Biochem. 204, 1-14.

-Wesenberg, Dirk; Kyriakides, Irene; Agathos, Spiros N. (2003) **White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents.** Biotechnology Advances, 22(1-2), 161-187.

-Williams, E J; Smolen V F. (1972) **Determination of CMC from liquid junction potential measurements**. Journal of pharmaceutical sciences, 61 (4), 639-41. Journal code: 2985195R. ISSN:0022-3549. PubMed ID 5014328 AN 72142247.

-Wilson, JD,; Hamilton, JK,; George, Fredrick W.; Catt, Kevin J.; Wilson, Jean D. (1979/1986) **Regulation of the onset of steroid hormone synthesis in fetal gonads.** Ontog. Recept. Reprod. Horm. Action, 411-20. CODEN : 41APA4 CAN 91:120818.

-Wood, P. M. (1994) **Pathways for production of Fenton's reagent by wood-rotting fungi.** FEMS Microbiol; Rev. 13, 313-320.

-Wu, X. Q.; Schork, F. J. (2001) **Kinetics of miniemulsion polymerization of vinyl acetate with nonionic and anionic surfactants.** School of Chemical Engineering, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, USA. Journal of Applied Polymer Science, 81(7), 1691-1699. Publisher: John Wiley & Sons, Inc., CODEN: JAPNAB ISSN: 0021-8995.

-Xia, J. Xia, Y. Nnanna, I. A. I. (**1995**) **Study on the retrofascial space of the dorsum nasi and its clinical significance**. *J. Agric. Food Chem.* (43) 867.

-Xu, G.; Goodell, B. (2001) **Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose.** Journal of Biotechnology, 87(1), 43-57.

-Yamada, Kimiho; Morita, Hiroshi. (1973) **Special type surfactants. I. Preparation and properties of derivatives of telomers of n-dodecyl alcohol and methyl acrylate.** Fac. Eng. Kumamoto Univ., Kamamoto, Japan. Yukagaku, 22 (12), 790-5.

-Yamada, Y.; Isoki, T.; Katsumi S. (1998) **Anticorrosive durable wood preservatives free from arsenic, chromine and organic solvents**. JP 10235612 A2.

-Yamaguchi, H. Kono, M.; Shirano, M. (2004) **water-in-oil cosmetic emulsion compositions containing copper chlorophyll and l-ascorbic acid fatty acid esters.** (nikko pharmaceutical Co., Ltd., Japan). Jpn. Kokai tokkyo Koho. 7 pp. JP 2004352651.

-Yamamoto, A.; Bhuiyan, M. N.; Waditee, R.; Tanaka, Y.; Esaka, M.; Oba, K.; Jagendorf, A. T. and Takabe, T. (2005) **Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in the tabacco and *Arabidopsis* plants.** Journal of experimental Botany. 56, 1785-1796.

-Yamashita, N.; Tanemura, H. and Kawanishi, S. (1999) **Mechanism of oxidative DNA damge induced by quercetin in the presence of Cu(II).** Mutat Res . 425(1), 107-115.

-Yan, J. Chen, D. (2003) **Preparation of fatty acid ester of ascorbic acid.** (Beijing Chenao Advanced Science and technology development Co. Ltd. Peop. Rep. China). Faming Zhuanli shenqing gongkai shuomingshu. 14 pp. CN 1428339.

-Yang, H.; Seib, P. A. (1992) **2-phosphorylation of D-erythrobic acid.** Dep. Grain Sci. Ind., Kansas State Univ., manhattan, KS, USA. Journal of carbohydrate Chemistry. 11(4), 485-98.

-Yazawa, Kazuyoshi; Ishikawa, Chikako; Kondo, Sei; Misawa, Yoshihisa; Kondo, Hisashi. **Preparation of 6 - O - docosahexaenoyl - L - ascorbic acid.** Jpn. Kokai Tokkyo Koho (1994), 4 pp.

-Yokozawa, T.; Cho, E.J.; Nakagawa, T.; Terasawa, K. and Takeuchi, S. (2000) **Inhibitory effect of green tea tannin on free radical-induced injury to the renal epithelial cell line, LLC-PK1**. Pharmacy and Pharmacology Communications, 6 (12), 521-526.

-You, Jai Choon. (2003) **Skin cleansing composition in form of cream and production thereof.** Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo, No pp. given. CODEN: KRXXA7 KR 2003094957 A 20031218 CAN 141: 415629 AN 2004: 987620.

-Yun, Z.; Takagi, M.; Yoshida, T. (2003) **Combined addition of glutathione and iron chelators for decrease of intracellular level of reactive oxygen species and death of Chinese hamster ovary cells**. Journal of Bioscience and Bioengineering, 95 (2), 124-127.

-Zabielska-Matejuk. J. (2005) **Antifungal propertiers of new quaternary ammonium compounds in relation to their surface activity.** Wood Sci Technol. 39, 235-243.

-Zhang, Xijun; Chen, Chaohui; Qiu, Mingjian; Zhang, Yali. (2008) **Method for producing white carbon black and recovering part of wrapped product from byproduct of organosilicon reaction.** Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu, 7pp.

-Zweifel, H. (1997) **Stabilization of Polymeric Materials**. Department of Materials, Institute of Polymers, ETHZ, Zurich, Switzerland.

Annexe 1

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/copyright

Author's personal copy

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 318 (2008) 134–140
COLLOIDS AND SURFACES A
www.elsevier.com/locate/colsurfa

Synthesis and properties of antioxidant amphiphilic ascorbate salts

Thierry Koumbi Mounanga [a,b], Philippe Gérardin [b], Boudah Poaty [b], Dominique Perrin [b], Christine Gérardin [a,*]

[a] *Équipe Matériaux Tensioactifs Polymères et Colloïdaux, LCPOC, UMR CNRS-UHP 7565, Nancy-Université, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre les Nancy, France*
[b] *Equipe Chimie Organique et Microbiologie, LERMAB, UMR INRA-ENGREF-UHP1093, Nancy-Université, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre les Nancy, France*

Received 18 April 2007; received in revised form 12 December 2007; accepted 17 December 2007
Available online 6 January 2008

Abstract

Synthesis of new surfactants with antioxidant properties was carried out from ascorbic acid and different fatty amines. Characterization of physicochemical properties of these new compounds indicated a classical behavior of cationic surfactants. Antioxidant properties, estimated using methyl linoleate oxidation inhibition and DPPH methods, were close to that of ascorbic acid tested in the same conditions. These compounds were investigated in the formulation of wood preservation mixtures containing propiconazole, a widely used fungicide, and compared to the formulation obtained with an industrial nonionic surfactant. Biological tests were carried out under laboratory conditions to evaluate the ability of these formulations to protect beech wood blocks exposed to *Coriolus versicolor*, a white rot fungus. Results indicated that using aqueous formulation of propiconazole allows reducing the quantity of biocide compared to solutions of the same concentrations in ethanol. Protection achieved with antioxidant surfactant was slightly superior to that obtained with conventional surfactant.
© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Antioxidant; Aqueous formulation; Fungicide; Surfactant; Wood

1. Introduction

Surfactants are widely used as detergents, cleaners, auxiliaries for textiles, leather and paper, chemical treatments and processes, cosmetic, pharmaceutical and food industries [1]. Comprising a water-soluble part and a hydrophobic part, surfactants are first used to reduce the surface tension of the liquid in which they are dissolved allowing the solubilization of compounds in this liquid. However, it could be of interest to synthesize surfactants with additional properties that could lead to specific applications. In that prospect, we have investigated the synthesis and characterization of amphiphilic compounds with antioxidant properties. Such compounds could find valuable applications in biological systems where radicals or active oxygen species like peroxides, hydroperoxides and hydroxyl radicals are involved or in processes where oxidations are involved in the degradation of different products like food or polymers. Due to the increasing trend to substitute chemicals from renewable origin for chemicals from petrochemical origin, we investigated the synthesis of surfactants derived from the reaction of ascorbic acid chosen as polar head with several fatty amines. Ascorbic acid (2,3-dehydro-L-gulonic acid γ-lactone, also known as vitamin C) is a powerful natural antioxidant. It has been reported to possess strong reductive properties due to the presence of the enediol moiety, leading to the use of some of its salts in medicinal preparations [2]. Ascorbic acid and its derivatives obtained by esterification of the primary hydroxyl group in position 6 with different carboxylic acids are strong radical scavengers with interesting applications as protective agents for fats, vitamins and other degradable materials [3–7]. Because of its structure, ascorbic acid is a water-soluble antioxidant, insoluble in fats and unable to penetrate the lipophilic membranes of biological systems. The addition of a hydrocarbon chain such as an ester confers to the ascorbyl esters amphiphilic properties allowing their solubilization and penetration in biomembranes, where they can perform their antioxidant function.

Wood is a naturally occurring polymer, consisting of cellulose, hemicelluloses and lignin, easily degraded by fungi, which

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 43 32; fax: +33 3 83 68 43 22.
E-mail address: Christine.Gerardin@lesoc.uhp-nancy.fr (C. Gérardin).

0927-7757/$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.colsurfa.2007.12.048

Author's personal copy

is its main disadvantage for outdoor applications. Although all the biochemical degradation mechanisms are not completely elucidated, the main role played by peroxidases (lignin and manganese peroxidases) in the case of white rots, or by hydroxyl radicals, generated via Fenton's reactions, in the case of brown rots, is well documented [8–10]. Involving many oxidative processes initiated by free radicals, these reactions lead to wood macromolecules depolymerization. Antioxidants have shown to be promising additives for the development of more environmentally safe preservative systems allowing reduction of the quantity of biocides [11–13].

This paper reports the synthesis, physicochemical characterization and application to wood preservation of new amphiphilic compounds derived from ascorbic acid and fatty amines, both obtained from renewable origin.

2. Experimental

Ascorbic acid and fatty amines were purchased from Acros Organics (Noisy le Grand, France) and Fluka–Sigma–Aldrich Chimie SARL (St. Quentin Fallavier, France). Simulsol 5815S is a mixture of glycerol polyethylene glycol ricinoleate and methoxypropanol in water furnished by Seppic (Paris, France). Propiconazole was generously furnished by Dyrup (Albi, France). Melting points (mp) were measured using a KOFLER melting point apparatus. Microanalyses were carried out on a Thermofinnigan Flash EA 1112 apparatus. Infrared analyses were performed on a PerkinElmer 1600 FTIR spectrometer as KBr disks for the solids. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a BRUKER AM 400 spectrometer with TMS as internal standard.

2.1. General procedure for the synthesis of alkyl ammonium ascorbate salts (AaCn)

Ascorbic acid (2 g, 11.3 mmol) was mixed in a 250 ml three-neck round-bottomed flask with fatty amine (11.3 mmol) in a mixture of water/methanol (1:3). The reaction was carried out under nitrogen agitating for 4 h at ambient temperature. The solvent was then evaporated under vacuum. The solid residue obtained was washed with a mixture of diethylether/methanol (60/40) and dried in a desiccator under vacuum over silica gel for 24 h. The products were identified with the code AaCn, where n corresponds to the number of carbon atoms of the fatty amine alkyl chain. Characteristics of AaCn compounds are given below.

IR: ν_{max}/cm^{-1} 3400–3000 (OH and NH_3^+), 2950 and 2850 (CH aliphatic), 1720 (C=O), 1620 (C=C). **1**H RMN (méthanol D_4): 0.9 ppm: *t*, ^{3}J = 6.5 Hz, 3H (a); 1.31 ppm: massif, 2*n* H (b); 1.6 ppm: m, 2H (c); 2.94 ppm: *t*, ^{3}J = 8 Hz, 2H (d); 3.85 and 3.87 ppm: 2dd, ^{2}J = 6.55 Hz, ^{3}J = 3 Hz, 2H (g); 3.94 ppm: m, 1H (f); 4.4 ppm: d, ^{3}J = 3 Hz, 1H (e). **13**C NMR (Methanol D_4): 14.86, 24.17, 27.90–30.59 (several peaks), 33.28, 41.15, 64.96, 72.41, 80.49, 116.10, 174.90, 178.42. Elemental analysis for AaC8 (Found: C, 55.33; H, 8.61; N, 4.68. Calc. for $C_{14}H_{27}NO_6$ requires C, 55.07; H, 8.91; N, 4.59). Elemental analysis for AaC12 (Found: C, 60.57; H, 9.59; N, 4.15. Calc. for $C_{18}H_{35}NO_6$ requires C, 59.81; H, 9.76; N, 3.87). Elemental analysis for AaC16 (Found: C, 63.12; H, 10.28; N, 3.36. Calc. for $C_{22}H_{43}NO_6$ requires C, 63.28; H, 10.38; N, 3.35). Elemental analysis for AaC18 (Found: C, 65.07; H, 10.69; N, 3.76. Calc. for $C_{24}H_{47}NO_6$ requires C, 64.69; H, 10.63; N, 3.14). AaC8 mp 65 °C; AaC12 mp 68 °C; AaC16 mp 69 °C; AaC18 mp 70 °C.

2.2. Surface activities

Surface tension measurements were made with a Krüss K10T tensiometer using the Wilhelmy-plate method. Aqueous solutions of the surfactants were prepared from stock solutions of known concentration by successive dilutions with distilled water. Their surface tension γ was measured at 25 °C after complete equilibrium of the system. Each value is a mean of three successive measurements. The estimated error of the surface tension measurements is ±1 mN/m.

2.3. Antioxidant activity by methyl linoleate oxidation assay

Antioxidant properties were investigated by evaluation of oxygen uptake inhibition during oxidation of methyl linoleate initiated by AIBN. Oxidation of methyl linoleate (1 ml of a 0.4 M solution in butan-1-ol) was performed in a closed borosilicate glass reactor containing 2 ml of 9×10^{-3} M solution of AIBN in butan-1-ol as initiator. The double shell reactor was set at 60 °C by an external heating bath. Oxygen (154 Torr) was bubbled by a gas-tight oscillating pump. A small condenser was inserted on the reactor in the gas circulation to ensure solvent condensation. Oxygen uptake was continuously monitored with a pressure transducer (Viatron model 104) in the presence of 1 ml of a 0.2 M solution of ascorbic acid or ascorbic acid derivatives (AaCn) in butan-1-ol to evaluate antioxidant properties. The volumes of the liquid and the gas phases were of 4 and 100 ml respectively. The antioxidant activity was evaluated by measuring the inhibition period (τ) using the method proposed by Tsepalov et al. [14], which corresponds to the period during which no oxygen uptake was detected. Reproducibility is estimated to ±10 min.

2.4. Antioxidant activity by DPPH assay

Radical scavenging activity of ascorbic acid and alkyl ammonium ascorbate was measured by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical method (DPPH method). DPPH in methanol is a stable radical, dark violet in color. Its color is bleached by its reaction with a hydrogen donor. Methanolic solutions of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (100 μM) and various concentrations of antioxidant (5–100 μM) were rapidly mixed in the kinetic accessory SFA-11 (Hi-Tech Scientific, Salisbury, United Kingdom). Absorbance was measured at 517 nm (a wavelength at which only 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl absorbs) for 30 min with a Lambda 16 PerkinElmer UV spectrophotometer. The antioxidant activity was evaluated using IC_{50} value, which corresponds to the antioxidant concentration scavenging 50% of DPPH. For similar measurements, a coefficient of variation of 9% has been obtained [15].

Author's personal copy

2.5. Application to wood preservative formulation

2.5.1. Micro-organism

The white-rot fungus used in this study was *Coriolus versicolor* (strain CTB 863A). Fungal stock cultures were maintained on malt-agar slants and kept at 4 °C before use.

2.5.2. Formulations

Solutions of propiconazole were prepared either directly in ethanol or formulated in water with different surfactants. Two formulations were investigated: the first one was prepared from AaC12 (0.17%) as surfactant, dipropylene glycol methyl ether (0.15%) as co-solvent and propiconazole (0.1%), while the second one, considered the reference formulation, was prepared from Simulsol 5815S (0.17%) an industrial surfactant used in the field of wood preservation, dipropylene glycol methyl ether (0.15%) as co-solvent and propiconazole (0.1%). Each formulation was impregnated in wood using vacuum pressure process with or without dilutions (1/10 and 1/100).

2.5.3. Wood treatment

Weighed (m_0) oven-dried beech (*Fagus sylvatica*) blocks (2.5 cm × 1 cm × 0.5 cm, the largest dimension being the longitudinal direction) were used for biological tests. Dried blocks were placed in a beaker inside a desiccator equipped with a two-way tap and subjected to a 5 mbar vacuum for 20 min. Blocks were then impregnated by suction with the solution. After a 2-h soaking, the blocks were removed, dried at 103 °C for 2 days and weighed (m_1).

2.5.4. Biological tests

Treated or untreated wood blocks (3 replicates) were placed in 9 cm Petri dishes on a sterile culture medium (malt (40 g)/agar (30 g)/distilled water (1 l)) previously exposed to *C. versicolor* during 2 weeks. Incubation was carried out for 16 weeks at 22 °C under controlled humidity conditions of 70% R.H. The blocks were then removed from the mycelium, dried at 103 °C for 2 days and weighed (m_2). All experiments were duplicated. The fungicidal efficiency of the treatment was estimated according to the weight loss of beech blocks due to fungal attack using the following formula:

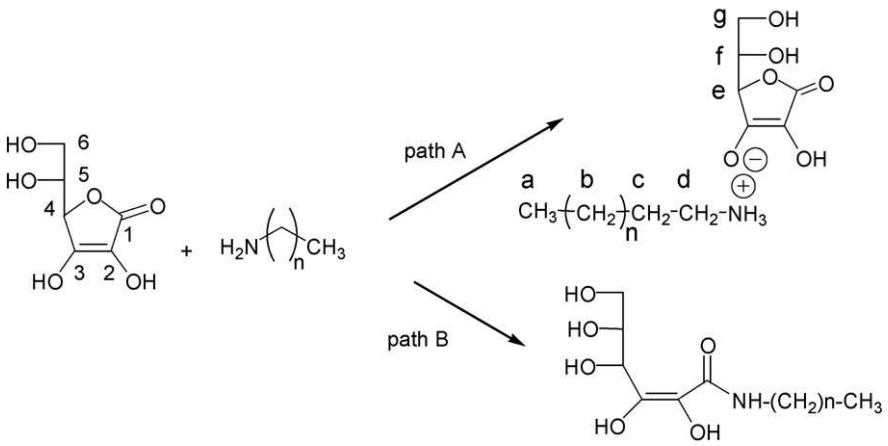
$$\mathrm{WL}(\%) = \left[\frac{(m_0 - m_2)}{m_0}\right] \times 100$$

where m_0 is the initial oven dried weight of the sample before exposure to *C. versicolor* and m_2 the oven dried weight of the sample after exposure to *C. versicolor*. Due to the low concentrations of the different solutions tested, m_1 and m_0 present quite similar values justifying the use of m_0 to calculate weight loss. Due to variations in the test fungus virulences recorded for different series of experiments, weight losses were normalized.

3. Results and discussion

Ascorbic acid is a complex molecule presenting several electrophilic groups. It contains four hydroxyl groups in positions 2, 3, 5 and 6 with different acidities allowing acid–base reactions (path A of Scheme 1). The OH in position 3 is the more acidic one ($pK_a = 4.2$), the hydroxyl in position 2 has a $pK_a = 11.6$, and those in positions 5 and 6 behave as secondary and primary alcohol ($pK_a \approx 17$ and 16 respectively) [3]. It also presents a lactone structure, which can be subject to ring opening in the presence of amine (path B of Scheme 1) [16–20].

Reactions were carried out in aqueous methanol under nitrogen at different temperatures from room temperature to 60 °C with 1 or 2 equivalents of amines for different times (1–48 h). After removal of solvent, washing of the crude product with diethyl ether, a more or less colored solid was obtained. In all cases, no evidence of opening of the lactone ring was obtained. All tested conditions lead only to the formation of the ascorbic acid alkyl ammonium salts as demonstrated by ^{1}H NMR, ^{13}C NMR and FTIR analyses. Formation of ascorbate salts is also supported by literature data concerning the synthesis of salts of L-ascorbic acid with different substituted amines and triphenylphosphine [2]. Integrity of the vitamin C moiety, which has been reported as a very sensitive molecule, has been investigated using several spectroscopic methods. The signal at 4.4 ppm observed by ^{1}H NMR is characteristic of the hydrogen at the C4 position of the vitamin C ring, while ^{13}C NMR gave 4 signals at 80.49, 116.10, 174.90 and 178.42 characteristic of C4,



Scheme 1. Possible reactions of ascorbic acid with amines.

Author's personal copy

Table 1
Physico-chemical properties of ascorbate salts

Amine	Product	Solubility in water at 25 °C (M)	γ_{CAC} (mN/m)	CAC (M)	σ (A^2)
Octylamine	AaC8	1.0×10^{-1}	28	17.7×10^{-4}	70
Dodecylamine	AaC12	2.3×10^{-1}	29	4.3×10^{-4}	74
Hexadecylamine	AaC16	3.5×10^{-2}	25	1.1×10^{-4}	78
Octadecylamine	AaC18	6.7×10^{-3}	30	0.5×10^{-4}	72

C2, C3 and C1 atoms respectively. Comparison of the UV–vis absorption spectrum of ascorbic acid, $\lambda_{max} = 256$ nm (10^{-4} M in water), with that of its alkyl ammonium salts indicated quite similar behavior, clearly demonstrating the integrity of the vitamin C moiety. The best conditions for the synthesis of ascorbic acid salts involved the use of one equivalent of amine in methanol at room temperature under nitrogen for 30 min. Under these conditions, no noticeable degradation of ascorbic acid cycle was observed. Products were obtained in quite quantitative yields as more or less white powders.

3.1. Surface properties

Since all these new compounds have been designed in view of their potential use as surfactants, some of their properties as surface-active agents have been examined. Self-association of surfactants is a well-known phenomenon. Hydrophobic interactions are the driving forces which induce the adsorption of the surfactant at the water/air interface. Once this surface is saturated, the surfactant molecules self-associate to minimize the free energy of the whole system. The surfactant properties of the aqueous solutions were evaluated by surface tension measurements (γ) carried out by the Wilhelmy method. Table 1 describes the different physico-chemical properties of ascorbate salts obtained by reacting one equivalent of ascorbic with one equivalent of fatty amine in aqueous methanol under nitrogen for 4 h.

Compared to ascorbic acid (solubility 1.8 M), salts of ascorbic acid/fatty amines are less soluble in water. The solubility was sufficient to obtain a γ versus log C (concentration) plot allowing determination of the Critical Aggregative Concentration (CAC) and of the minimal surface tension γ_{CAC}. Curves typical of mono-disperse surfactants were obtained for all the synthesised products (Fig. 1). For concentrations superior to CAC, γ is almost constant and equal to the minimum value of γ attainable with a given amphiphilic compound. The obvious alignment of the points below, and the constant values of γ above the CAC, as well as the sharp break in the curve, were in accordance with the purity of the compounds.

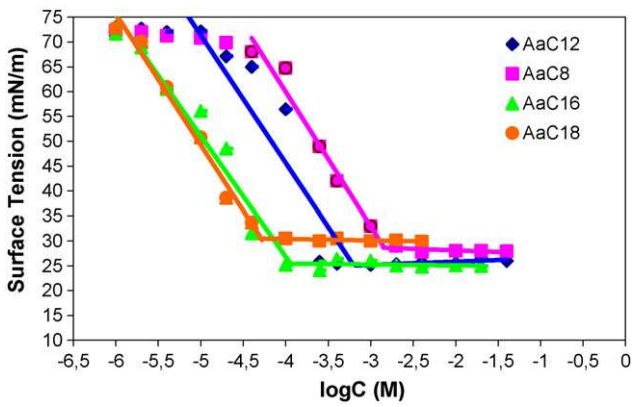


Fig. 1. CAC determination with Wilhelmy-plate method of AaCn.

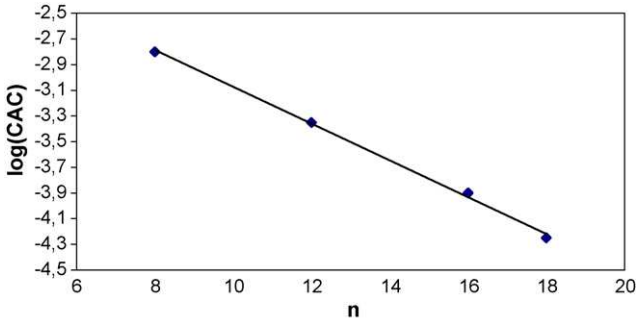


Fig. 2. Relation between log(CAC) and n (number of CH_2).

At room temperature, all the synthesized compounds lower the surface tension of water to about 30 mN/m, which is a classical behavior for hydrogenated surfactants. Depending on the product, the CAC ranges from 10^{-3} to 10^{-5} M. CAC of the surfactant decreases with increasing alkyl chain length. When the length of the chain increases by two CH_2, the CAC values decrease by a factor of *ca.* 4, which is in good agreement with results described for cationic hydrogenated surfactant [21]. Comparatively, the CACs of alkyl ammonium ascorbates are smaller than those of alkylammonium chlorides (about 10^{-3} M) [22,23], but similar to that of ascorbyl alcanoates (8×10^{-4} M) [24].

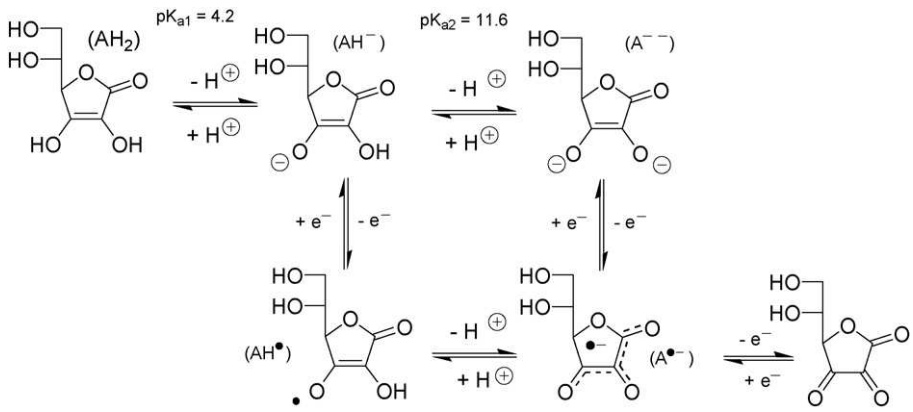
The evolution of log(CAC) as a function of the length of hydrophobic chain is shown in Fig. 2. Results indicate a linear relationship characterized by the equation $\log(CAC) = A - Bn$, where A and B are constants and n corresponds to the number of CH_2. B is determinated to be equal to -0.15, and this confirms the classical behavior of alkyl ammonium ascorbate as cationic surfactant with a B value similar to that of alkyl ammonium chloride ($B = -0.22$). The value of A indicates more hydrophobic properties in comparison to alkyl ammonium chloride (compare -1.53 for alkyl ammonium ascorbate to 0.75 for ammonium chloride).

The area per surface head group for these cationic surfactants (Table 1) is in agreement with literature. The minimum area per surfactant head group at the micellar interface σ in Å^2 was calcu-

Table 2
Antioxidant properties of ascorbic acid and its ascorbate salts

Antioxidant	τ (min)	IC_{50} (μmol/l)
Ascorbic acid	52	20.3
AaC8	50	53.4
AaC12	58	63.6
AaC16	44	44.8
AaC18	62	40.7

Author's personal copy



Scheme 2. Mechanism of oxidation of ascorbic acid.

lated from the slope of the γ versus log C curve before the CAC and using the classical Gibbs equation. The surface saturation Γ_{max} provides information about the maximum adsorption of surfactant at the air/water interface and can be calculated using the Gibbs adsorption equation for diluted systems [25].

$$\Gamma_{max} = -\left(\frac{1}{4.606RT}\right)\left(\frac{d\gamma}{d\log C}\right)$$

$$(R = 8.314\,\mathrm{J\,K^{-1}\,mol^{-1}})$$

From the surface excess values, it is possible to calculate the minimum area per molecule in Å^2 at the air/water interface using the following relation where N_A stands for Avogadro's number (6.022×10^{23} mol^{-1}):

$$A_{min} = \frac{10^{20}}{N_A\,\Gamma_{max}}$$

3.2. Antioxidant properties

The antioxidant properties of ascorbic acid and of its salts are shown in Table 2.

It is obvious from these results that alkyl ammonium ascorbate salts as ascorbic acid are able to slow down oxidation of methyl linoleate induced by AIBN. Inhibition oxidation periods (τ) of the different compounds are relatively close (44–62 min). Due to the values of inhibition period measured, it seems however difficult to evaluate more precisely the effect of the size of the alkyl chain. Some ascorbate salts possess slightly higher antioxidant properties than ascorbic acid, while others possess slightly lower properties. The DPPH assay allows determination of IC_{50} value corresponding to the concentration at which 50% of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical is scavenged. A lower IC_{50} value corresponds to a larger scavenging activity. As shown in Table 2, ascorbic acid possesses higher radical scavenging activity in comparison to the different ascorbate salts. IC_{50} value of ascorbic acid is similar to that reported [26] in the literature (compare 20.3 to 20.8), while those of the ascorbate salts are close to 45 except in the case of AaC12, which presents lower radical scavenging activity. Even if the exact effect of the size of the alkyl chain remains unclear, it is obvious from these results that fatty ammonium salts of ascorbic acid possess antioxidant properties. According to literature [27], ascorbic acid (AH_2) commonly reacts as an electron donor to yield a free radical ($AH^{\bullet}$) or a radical anion ($A^{-\bullet}$) leading to dehydroascorbic acid as final oxidation product. The formation of the radical anion ($A^{-\bullet}$) is facilitated through its stability attributed to its pseudo-aromaticity [28]. Oxidation processes are reported in Scheme 2.

According to the mechanism of oxidation, it is not surprising that ascorbate salts are able to scavenge both AIBN initiated radicals as well as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical. Because pK_{a2} is 11.6, the dianion is an exceedingly small fraction of total ascorbate in solution. However, the stability of the radical anion ($A^{-\bullet}$) shifts the equilibrium to the right. The lower antioxidant properties of ascorbate salts observed in the DPPH assay could be due to the higher steric hindrance of alkyl ammonium ascorbate salts in comparison to ascorbic acid reducing electronic transfer with hindered 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical. Another explanation may be as follows. As Scheme 2 shows, ascorbic acid may give up two H atoms to DPPH. The hydroxylic H atom in position 3 is no longer present in modified acids, which might result in an IC_{50} twice as large as the ascorbic acid IC_{50}, in agreement with our observations. This effect is not observed in the oxygen uptake method, but it has been shown that correlation between the two methods is poor [15].

3.3. Application to wood preservative formulation

Behavior of the AaC12 salt was then investigated in aqueous formulation of propiconazole, a widely used fungicide for wood preservation. The advantage of AaC12 compared to traditional surfactants lies in the fact that not only can it solubilize insoluble organic compounds in water, but it also exhibits some antioxidant properties likely to increase biological properties of propiconazole through synergistical or additive effects. AaC12 salt, ascorbic acid and dodecylamine hydrochloride were also tested alone to evaluate their effect on fungal development. Impregnated wood blocks were exposed to *Coriolus versicolor*, a wood rotting fungus, for 16 weeks and effect of the treatment was evaluated according to wood weight losses due to fungal

Author's personal copy

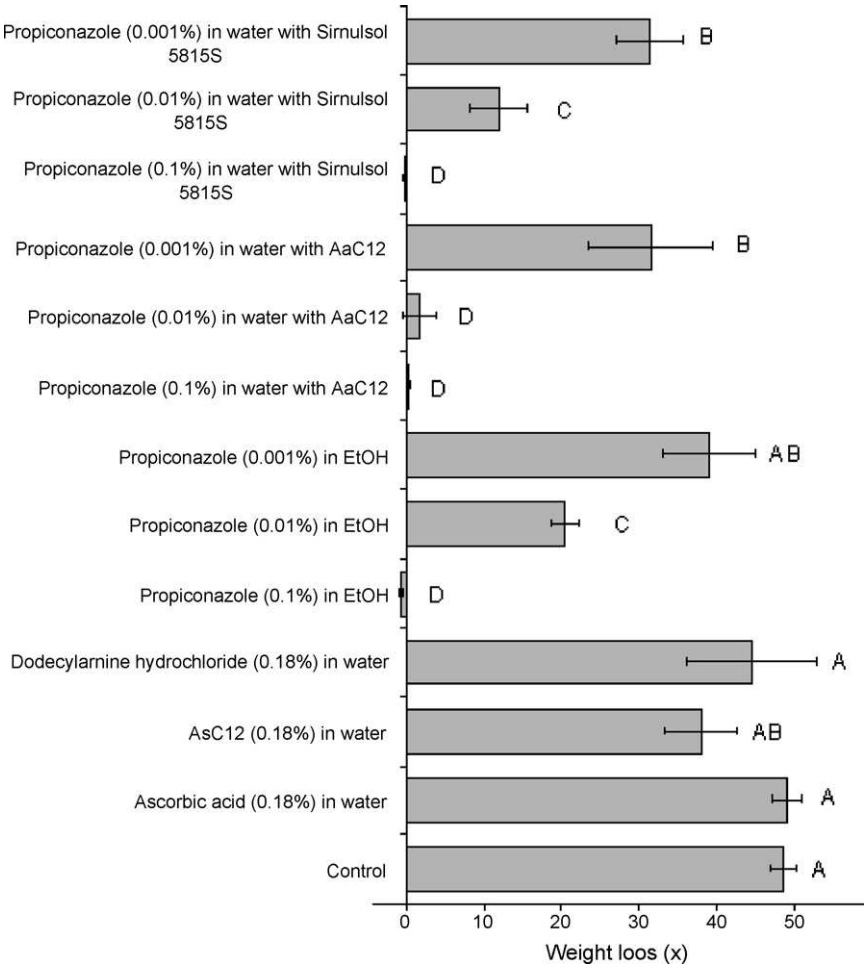


Fig. 3. Evolution of weight losses of wood samples impregnated with the different formulations exposed to *Coriolus versicolor*. Error bars represent standard deviations. Systems not connected by the same letter are largely different, at the 5% level.

attack. Results are presented in Fig. 3. A statistical analysis of data of the figure (one-way analysis of variance) using the JMP program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) allows to class results in five categories from A to E as indicated in Fig. 3. Systems not connected by the same letter are largely different, at the 5% level.

At 0.001% propiconazole concentration, aqueous formulations show higher efficiencies compared to the ethanolic solution. At 0.01% concentration, propiconazole formulated with AaC12 presents the highest efficiency. No weight loss was observed for blocks treated at 0.1% of propiconazole, whatever the formulation used. The effect of antioxidant properties is more difficult to evaluate. Depending on the concentration of propiconazole, a small effect could be observed or not. However, the significance of this effect is low and must be confirmed by additional experiments. Effect of ascorbic acid, dodecylamine hydrochloride and AaC12 at concentrations similar to that of surfactants in the tested formulations was also investigated. In all cases, wood blocks were strongly degraded indicating no effect of these compounds at the tested concentrations. These results clearly demonstrate that ascorbate salts behave as classical surfactants. They have been shown to possess interesting antioxidant properties during methyl linoleate oxidation and DPPH assays, hence could be of valuable interest to formulate active substances sensitive to oxidation reactions.

4. Conclusion

The synthesis of antioxidant amphiphilic salts, derived from renewable materials like ascorbic acid and fatty amines, is well established. The physicochemical study shows that the synthesized compounds behave as traditional cationic surfactants and possess antioxidant properties. Surfactant properties of alkyl ammonium ascorbates are strongly influenced by the length of the fatty alkyl amine used, while effect of the chain length on the antioxidant properties is less obvious. Biological tests indicate that propiconazole formulated in aqueous solutions show improved activity compared to propiconazole used at the same concentration in ethanol. Reasons of this behavior are not clear, but could be due to a higher penetration of the biocide in the wood structure leading to a higher concentration of propiconazole or to a better fungicidal activity due to the presence of surfactant. In comparison to conventional formulations, the use of antioxidant amphiphilic ascorbate salts, gives a slight increase protection provided to beech wood against *Coriolus versicolor*. Further experiments are currently under

Author's personal copy

investigation to more precisely evaluate the potentiality of such surfactants.

References

[1] M. Patel, J. Ind. Ecol. 7 (2004) 47–62.
[2] E.A. Dikusar, N.G. Kozlov, L.A. Mel'nichuk, Chem. Nat. Compd. 40 (2004) 406–407.
[3] G. Capuzzi, P. Lo Nostro, K. Kulkarni, J.E. Fernadez, Langmuir 12 (1996) 3957–3963.
[4] G. Capuzzi, P. Lo Nostro, K. Kulkarni, J.E. Fernadez, F.F. Vincieri, Langmuir 12 (1996) 5413–5418.
[5] G. Capuzzi, K. Kulkarni, J.E. Fernadez, F.F. Vincieri, P. Lo Nostro, J. Colloid Interface Sci. 186 (1997) 271–279.
[6] P. Lo Nostro, G. Capuzzi, A. Romani, N. Mulinacci, Langmuir 16 (2000) 1744–1750.
[7] P. Lo Nostro, G. Capuzzi, P. Pinelli, N. Mulinacci, A. Romani, F.F. Vincieri, Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 167 (2000) 83–93.
[8] Z. Kerem, K.A. Jensen, K.E. Hammel, FEBS Lett. 446 (1999) 49–54.
[9] K. Fackler, C. Gradinger, B. Hinterstoisser, K. Messner, M. Schwanninger, Enzyme Microb. Technol. 39 (2006) 1476–1483.
[10] B. Goodell, G. Daniel, J. Jellison, Y. Qian, Holzforschung 60 (2006) 630–636.
[11] T.P. Schultz, D.D. Nicholas, Phytochemistry 54 (2000) 47–52.
[12] T.P. Schultz, D.D. Nicholas, Phytochemistry 61 (2002) 555–560.
[13] A. Mabicka, S. Dumarçay, N. Rouhier, M. Linder, J.P. Jacquot, P. Gérardin, E. Gelhaye, IRG/WP 04-30331, Ljubjana, 2004.
[14] V.F. Tsepalov, A.A. Kharitonova, G.P. Gladyshev, N. M. Emanuel. Kinet. Catal. 18 (1977) 1261–1267.
[15] P.N. Diouf, A. Merlin, D. Perrin, Ann. For. Sci. 63 (2006) 525–534.
[16] J.R. Ella-Menye, V. Sharma, G. Wang, J. Org. Chem. 70 (2005) 463–469.
[17] V. Emmanouil, M. El Ghoul, C. André-Barrès, B. Guidetti, I. Rico-Lattes, A. Lattes, Langmuir 14 (1998) 5389–5395.
[18] S. Aury, P. Rubini, C. Gérardin, C. Selve, Eur. J. Org. Chem. 9 (2004) 2057–2066.
[19] H.B. Frykman, T. Isbell, S.C. Cermak, J. Surf. Detergents 3 (2000) 179–183.
[20] T. Kida, N. Morishima, A. Masuyama, Y. Nakatsuji, J. Am. Oil Chem. Soc. 71 (1994) 705–709.
[21] A. Berthod, J. Chim. Phys. 80 (1983) 407.
[22] D.W. Fuersteman, R. Herrera-Urbina, in: D.N. Rubingh, P.M. Holland (Eds.), Surfactants Sciences Series 37, Cationic Surfactants, Marcel Dekker, New York, 1991, p. 415.
[23] R.W. Smith, in: P. Somasundaran, B.M. Moudgil (Eds.), Reagents in Mineral Technology, Marcel Dekker, New York, 1988, pp. 219–256.
[24] S. Palma, P. Lo Nostro, R. Manzo, D. Allemandi, Eur. J. Pharm. Sci. 16 (2002) 37–43.
[25] K. Anand, O.P. Yadav, P.P. Singh, Colloïds Surf. 55 (1991) 345–349.
[26] D. Mazor, L. Greenberg, D. Shamir, D. Meyerstein, N. Meyerstein, Biochem. Biophys. Res. Co. 349 (2006) 1171–1175.
[27] D. Njus, V. Jalukar, J. Zu, P.M. Kelley, Am. J. Clin. Nutr. 54 (1991) 1179S–1183S.
[28] Y. Abe, S. Okada, H. Horii, S. Taniguchi, S. Yamabe, J. Chem. Soc. Perkin Trans. II (1987) 715–720.

Annexe 2

IRG/WP 08-50XXX

THE INTERNATIONAL RESEARCH GROUP ON WOOD PROTECTION

Section 3 WOOD PROTECTING CHEMICALS

Effect of amphiphilic antioxidant alkyl ammonium ascorbate on inhibition of fungal growth: Application to wood preservatives formulation

Christine Gérardin[a], Thierry Koumbi Mounanga[a,b], Philippe Gérardin[b]

[a] Laboratoire de Chimie Physique Organique et Colloîdale,
Equipe Synthèse et Assemblage de Molécules Amphiphiles, UMR CNRS-UHP 7565

[b]Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois,

Equipe Chimie Organique et Microbiologie, UMR_A 1093

Nancy Universités, Faculté des Sciences et Techniques,

BP 239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Paper prepared for the 39th Annual Meeting
Istambul, Turkey
25-29 May 2008

IRG SECRETARIAT
Box 5609
SE-114 86 Stockholm
Sweden

www.irg-wp.com

Effect of amphiphilic antioxidant alkyl ammonium ascorbate on inhibition of fungal growth. Application to wood preservatives formulation

Christine Gérardin[a], Thierry Koumbi Mounanga[a,b], Philippe Gérardin[b]

[a] Laboratoire de Chimie Physique Organique et Colloîdale,
Équipe Matériaux Tensioactifs Polymères et Colloïdaux, UMR CNRS-UHP 7565

[b]Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois,

Equipe Chimie Organique et Microbiologie, UMR_A 1093

Nancy Universités, Faculté des Sciences et Techniques,

BP 239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ABSTRACT

Amphiphilic surfactants were synthesized from ascorbic acid and different fatty amines and evaluated for formulation of wood preservation products. Characterization of physicochemical properties of the new compounds indicated classical behavior of cationic surfactants. Antioxidant properties, estimated using methyl linoleate oxidation inhibition method, were similar to that of ascorbic acid tested in the same conditions. Growth inhibition assays indicated that amphiphilic dodecylammonium ascorbate is able to inhibit *Coriolus versicolor* mycelium development, while butylammonium ascorbate deprived of surfactant properties has no effect. This compound was then investigated in the formulation of wood preservation mixtures containing propiconazole and compared to formulation obtained with an industrial surfactant. Biological tests based on the ability of these formulations to protect beech wood blocks exposed to a white rot fungus *Coriolus versicolor* were carried out under laboratory conditions. Results indicated that use of propiconazole formulation in aqueous solution allows to reduce the quantity of biocide compared to solutions of the same concentrations in ethanol. Protection achieved with antioxidant surfactant was slightly superior to that conferred by conventional surfactant.

Keywords: antioxidant, aqueous formulation, ascorbic acid, fungicide, growth inhibition, surfactant, wood

1. INTRODUCTION

The increasing environmental pressure appeared during the last years has led to important changes in the field of wood preservation in industrialised countries. This has lead to the adoption by European Community of different regulations like Biocides Directive adopted in 1998 to limit effects of biocides in regards to their toxicity and more recently REACH regulation aimed to improve the protection of human health and of the environment through the better and earlier identification of the intrinsic properties of chemical substances. As a result of these, many wood preservation products have been banned or their use restricted leading to the development of more friendly acceptable alternatives. Different studies reported in the literature have shown that metals chelators and antioxidants may be promising additives for the development of more

environmentally benign preservative systems (Suttie et al. 1996; Baya et al. 2001; Schultz and Nicholas 2000 and 2002; Mabicka et al. 2004; Bakhsous et al. 2006). Used in mixture with different preservatives, like triazoles or quaternary ammonium, these compounds allowed to reduce the quantities of biocides necessary to prevent wood from fungal degradation. Although the mechanisms of action of these additives are not completely understood, they are supposed to interact with enzymatic systems involved in wood biodegradation like peroxidases (Lignin and Manganese peroxidases) in the case of white rots or hydroxyl radicals, generated via Fenton's reactions, in the case of brown rots (Hammel 1997; Kerem et al. 1999). Another important change in the field of wood preservation concerns solvents used for a long time to solubilize organic biocides, which are now replaced as often as that is possible by water requiring the use of surfactants to solubilize the active ingredients. Composed of a water soluble part and a hydrophobic part, surfactants are initially used to reduce the surface tension of the liquid in which they are dissolved allowing the solubilization of compounds insoluble in this liquid. However, it could be of interest to synthesize surfactants with additional properties which could lead to specific applications. In this context, we have investigated synthesis and characterization of amphiphilic compounds with antioxidant properties. Moreover, the toxicity of some of surfactants used currently and the increasing trend to substitute chemicals from renewable origin for chemicals from petrochemical origin, prompt us to investigate the synthesis of surfactants derived from the reaction of ascorbic acid chosen as polar head with several fatty amines. Ascorbic acid (2,3-dehydro-L-gulonic acid γ-lactone, also known as vitamin C) is a powerful natural antioxidant. It has been reported to possess strong reductive properties due to the presence of the enediol moiety, leading to the use of some of its salts in medicinal preparations (Dikusar et al, 2004). Ascorbic acid and its derivatives obtained by esterification of the primary hydroxyl group in position 6 with different carboxylic acids are strong radical scavengers with interesting applications as protective agents for fats, vitamins and other degradable materials (Capuzzi et al, 1996, Capuzzi, 1996, Capuzzi 1997, Lo Nostro, 2000, Lo Nostro, 2000). Because of its structure, ascorbic acid is a water-soluble antioxidant, insoluble in fats and unable to penetrate the lipophilic membranes of biological systems. The addition of a hydrocarbon chain such as an ester confers to the ascorbyl esters amphiphilic properties allowing their solubilization and penetration in biomembranes, where they can perform their antioxidant function. The aim of this paper is to report our investigations concerning antifungal and antioxidant properties of amphiphilic alkylammonium ascorbates easily obtained from ascorbic acid and fatty amines.

2. MATERIELS AND METHODS

2.1. Material

Ascorbic acid and amines were purchased from Acros Organics (Noisy le Grand, France) and Fluka-Sigma-Aldrich Chimie SARL (St Quentin Fallavier, France). Simulsol 5815S is a mixture of glycerol polyethylene glycol ricinoleate and methoxypropanol in water furnished by Seppic (Paris, France). Propiconazole was generously furnished by Dyrup (Albi, France), while DDAC was furnished by OBBIA (Aubazine, France). Melting points (mp) were measured using a KOFLER melting point apparatus. Microanalyses were carried out on a Thermofinnigan Flash EA 1112 apparatus. Infrared analyses were performed on a PERKIN-ELMER 1600 FTIR spectrometer as KBr disks for the solids. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a BRUKER AM 400 spectrometer with TMS as internal standard.

2.2. General procedure for the synthesis of alkyl ammonium ascorbate salts (AaCn)

Ascorbic acid (2 g, 11.3 mmol) was mixed in a 250 ml three neck round-bottomed flask with fatty amine (11.3 mmol) in a mixture of water/methanol (1:3). The reaction was carried out under nitrogen agitating for 4 hours at ambient temperature. The solvent was then evaporated

under vacuum. The solid residue obtained was washed with a mixture of diethylether/methanol (60/40) and dried in a desiccator under vacuum over silica gel for 24 h. The products were identified with the code AaCn, where n corresponds to the number of carbon atoms of the fatty amine alkyl chain. Characteristics of AaCn compounds are given below.

IR : ν_{max}/cm^{-1} 3400 to 3000 (OH and NH_3^+) , 2950 and 2850 (CH aliphatic), 1720 (C=O), 1620 (C=C) .**^{1}H RMN** (méthanol D_4) : 0.9 ppm : t, ^3J = 6.5 Hz, 3H (a) ; 1.31 ppm : massif, 2n H (b) ; 1.6 ppm : m, 2H (c) ; 2.94 ppm : t, ^3J = 8 Hz, 2H (d) ; 3.85 and 3.87 ppm : 2dd, ^2J = 6.55 Hz, ^3J = 3 Hz, 2H (g) ; 3.94 ppm : m, 1H (f) ; 4.4 ppm : d, ^3J = 3 Hz, 1H (e). **^{13}C NMR** (Methanol D_4): 14.86, 24.17, 27.90 to 30.59 (several peaks), 33.28, 41.15, 64.96, 72.41, 80.49, 116.10, 174.90, 178.42.Elemental analysis for **AaC8** (Found: C, 55.33; H, 8.61; N, 4.68. Calc. for $C_{14}H_{27}NO_6$ requires C, 55.07; H, 8.91; N, 4.59). Elemental analysis for **AaC12** (Found: C, 60.57; H, 9.59; N, 4.15. Calc. for $C_{18}H_{35}NO_6$ requires C, 59.81; H, 9.76; N, 3.87). Elemental analysis for **AaC16** (Found: C, 63.12; H, 10.28; N, 3.36. Calc. for $C_{22}H_{43}NO_6$ requires C, 63.28; H, 10.38; N, 3.35). Elemental analysis for **AaC18** (Found: C, 65.07; H, 10.69; N, 3.76. Calc. for $C_{24}H_{47}NO_6$ requires C, 64.69; H, 10.63; N, 3.14). **AaC8** mp 65°C; **AaC12** mp 68°C; **AaC16** mp 69°C; **AaC18** mp 70°C.

2.3. Determination of surface activities

Surface tension measurements were made with a Krüss K10T tensiometer using the Wilhelmy-plate method. Aqueous solutions of the surfactants were prepared from stock solutions of known concentration by successive dilutions with distilled water. Their surface tension γ was measured at 25°C after complete equilibrium of the system. Each value is a mean of three successive measurements. The estimated error of the surface tension measurements is ±1 mN/m.

2.4. Determination of antioxidant properties

2.4.1. Antioxidant activity by methyl linoleate oxidation assay

Antioxidant properties were investigated by evaluation of oxygen uptake inhibition during oxidation of methyl linoleate initiated by AIBN. Oxidation of methyl linoleate (1ml of a 0.4 M solution in butan-1-ol) was performed in a closed borosilicate glass reactor containing 2 ml of 9.10^{-3} M solution of AIBN in butan-1-ol as initiator. The double shell reactor was set at 60°C by an external heating bath. Oxygen (154 Torr) was bubbled by a gas-tight oscillating pump. A small condenser was inserted on the reactor in the gas circulation to ensure solvent condensation. Oxygen uptake was continuously monitored with a pressure transducer (Viatron model 104) in the presence of 1ml of a 0.2 M solution of ascorbic acid or ascorbic acid derivatives (AaCn) in butan-1-ol to evaluate antioxidant properties. The volumes of the liquid and the gas phases were of 4 and 100 ml respectively. The antioxidant activity was evaluated by measuring the inhibition period (τ), which corresponds to the period during which no oxygen uptake was detected. Reproducibility is estimated to ± 10 min.

2.4.2. Antioxidant activity by DPPH assay

Radical scavenging activity of ascorbic acid and alkyl ammonium ascorbate was measured by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical method (DPPH method). DPPH in methanol is a stable radical, dark violet in color. Its color is bleached by its reaction with a hydrogen donor. Methanolic solutions of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (100µM) and various concentrations of antioxidant (5–100 µM) were rapidly mixed in the kinetic accessory SFA-11 (Hi-Tech Scientific, Salisbury, United Kingdom). Absorbance was measured at 517 nm (a wavelength at which only 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl absorbs) for 30 min with a Lambda 16 Perkin Elmer UV spectrophotometer. The antioxidant activity was evaluated using IC_{50} value,

which corresponds to the antioxidant concentration scavenging 50% of DPPH. For similar measurements, a coefficient of variation of 9% has been obtained (*Diouf et al., 2006).*

2.5. Evaluation of antifungal properties

2.5.1. Micro-organism

The white-rot fungus used in this study was *Coriolus versicolor* (strain CTB 863A). Fungal stock cultures were maintained on malt-agar slants and kept at 4°C before use.

2.5.2. Growth inhibition assay

Culture medium was prepared from malt (20 g) and agar (40 g) in distilled water (1 l) and sterilized (20 min., 120°C, 1 bar). Introduction of the different tested products was carried out by addition of the necessary quantity of product solubilized in the minimum amount of water under aseptical conditions. Plates were inoculated in their center with a small portion of a malt agar freshly grown *Coriolus versicolor* colony. Petri dishes were kept at 22°C at 70% RH. Growth was evaluated every day by measuring the diameter of the colony estimated from the mean of two perpendicular diameters and expressed as a percentage of the room available for growth, i.e. the diameter of the dish. Growth inhibition was calculated according to the formula:

Growth Inhibition (%) = $100 \times (1 - d_1/d_0)$

where d_0 is the diameter of the control culture and d_1 the diameter of the culture in the presence of the tested product. All experiments are repeated two times.

2.5.3. Application to wood preservative formulation

Solutions of propiconazole were prepared either directly in ethanol or formulated in water with different surfactants. Two formulations were investigated: the first one was prepared from AaC12 (0.17%) as surfactant, dipropylene glycol methyl ether (0.15%) as co-solvent and propiconazole (0.1%), while the second one, considered the reference formulation, was prepared from Simulsol 5815S (0.17%) an industrial surfactant used in the field of wood preservation, dipropylene glycol methyl ether (0.15%) as co-solvent and propiconazole (0.1%). Each formulation was impregnated in wood using vacuum pressure process with or without dilutions (1/10 and 1/100).

Weighed (m_0) oven-dried beech (*Fagus sylvatica*) blocks (2 .5 cm x 1 cm x 0.5 cm, the largest dimension being the longitudinal direction) were used for biological tests. Dried blocks were placed in a beaker inside a desiccator equipped with a two-way tap and subjected to a 5 mbar vacuum for 20 min. Blocks were then impregnated by suction with the solution. After a two-hour soaking, the blocks were removed, dried at 103°C for two days and weighed (m_1).

Treated or untreated wood blocks (3 replicates) were placed in 9 cm Petri dishes on a sterile culture medium (malt (40 g) / agar (30 g) / distilled water (1 l)) previously exposed to *C. versicolor* during two weeks. Incubation was carried out for 16 weeks at 22°C under controlled humidity conditions of 70 % R.H. The blocks were then removed from the mycelium, dried at 103°C for two days and weighed (m_2). All experiments were duplicated. The fungicidal efficiency of the treatment was estimated according to the weight loss of beech blocks due to fungal attack using the following formula:

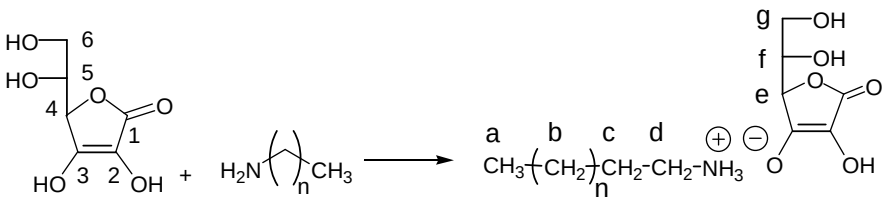
WL (%) = $[(m_0 - m_2)/m_0] \times 100$

where m_0 is the initial oven dried weight of the sample before exposure to *C. versicolor* and m_2 the oven dried weight of the sample after exposure to *C. versicolor*. Due to the low concentrations of the different solutions tested, m_1 and m_0 present quite similar values justifying the use of m_0 to calculate weight loss. Due to variations in the test fungus virulences recorded for different series of experiments, weight losses were normalized.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Synthesis ascorbate salts by reaction of ascorbic acid with amines

Compounds used for wood preservation product formulation must be easily available and of low toxicity for human health and of the environment. Ascorbic acid is complex molecule recognized as safe presenting several electrophilic groups. It contains four hydroxyl groups in positions 2, 3, 5 and 6 with different acidities allowing acid-base reactions. The OH in position 3 is the more acidic one (pKa = 4.2), the hydroxyl in position 2 has a pKa = 11.6, and those in positions 5 and 6 behave as secondary and primary alcohol (pKa ≈ 17 and 16 respectively) Capuzzi et al, 1996. Reaction of hydrogen of hydroxyl group in position 3 allows therefore formation of potential cationic surfactants with antioxidant properties (Scheme 1).



Scheme 1. Formation of cationic surfactant by reaction of ascorbic acid with amines

Reactions of ascorbic acid were carried out in aqueous methanol under nitrogen at room temperature with 1 equivalent of amine. After removal of solvent, washing of the crude product with diethyl ether, a more or less colored solid was obtained. Contrary to other studies where reaction of amines with lactones leaded to amide formation via ring opening reaction (Emmanouil et al, 1998; Ella-Menye et al, 2005; Aury et al 2004), only formation of ascorbate salts was observed. Formation of the salts was demonstrated by NMR analyses as well as literature data concerning the synthesis of salts of L-ascorbic acid with different substituted amines and triphenylphosphine (Dikusar et al, 2004).. Integrity of the vitamin C moiety, which has been reported as a very sensitive molecule, has been investigated using several spectroscopic methods. The signal at 4.4 ppm observed by ^{1}HNMR is characteristic of the hydrogen at the C4 position of the vitamin C ring, while ^{13}CNMR gave 4 signals at 80.49, 116.10, 174.90 and 178.42 characteristic of C4, C2, C3 and C1 atoms respectively. Comparison of the UV-visible absorption spectrum of ascorbic acid, λ_{max} = 256 nm (10^{-4}M in water), with that of its alkyl ammonium salts indicated quite similar behavior, clearly demonstrating the integrity of the vitamin C moiety. Products were obtained in quite quantitative yields as more or less white powders.

3.2. Surface properties

Since all these new compounds have been designed in view of their potential use as surfactants, some of their properties as surface-active agents have been examined. Self-association of surfactants is a well-known phenomenon. Hydrophobic interactions are the driving forces which induce the adsorption of the surfactant at the water /air interface. Once this surface is saturated, the surfactant molecules self-associate to minimize the free energy of the whole system. The surfactant properties of the aqueous solutions were evaluated by surface tension measurements (γ) carried out by the Wilhelmy method. Table 1 describes the different physico-chemical properties of ascorbate salts obtained.

Table 1. Physico-chemical properties of ascorbate salts

Amine	Product	Solubility in water at 25°C (M)	γ_{CAC} (mN/m)	CAC (M)
Octylamine	AaC_8	$1.0\ 10^{-1}$	28	$17.7\ 10^{-4}$
Dodecylamine	AaC_{12}	$2.3\ 10^{-1}$	29	$4.3\ 10^{-4}$
Hexadecylamine	AaC_{16}	$3.5\ 10^{-2}$	25	$1.1\ 10^{-4}$
Octadecylamine	AaC_{18}	$6.7\ 10^{-3}$	30	$0.5\ 10^{-4}$

Compared to ascorbic acid (solubility 1.8 M), salts of ascorbic acid / fatty amines are less soluble in water. The solubility was sufficient to obtain a γ vs. log C (concentration) plot allowing determination of the Critical Aggregative Concentration (CAC) and of the minimal surface tension γ_{CAC}. Curves typical of mono-disperse surfactants were obtained for all the synthesised products (Figure 1). For concentrations superior to CAC, γ is almost constant and equal to the minimum value of γ attainable with a given amphiphilic compound. The obvious alignment of the points below, and the constant values of γ above the CAC, as well as the sharp break in the curve, were in accordance with the purity of the compounds.

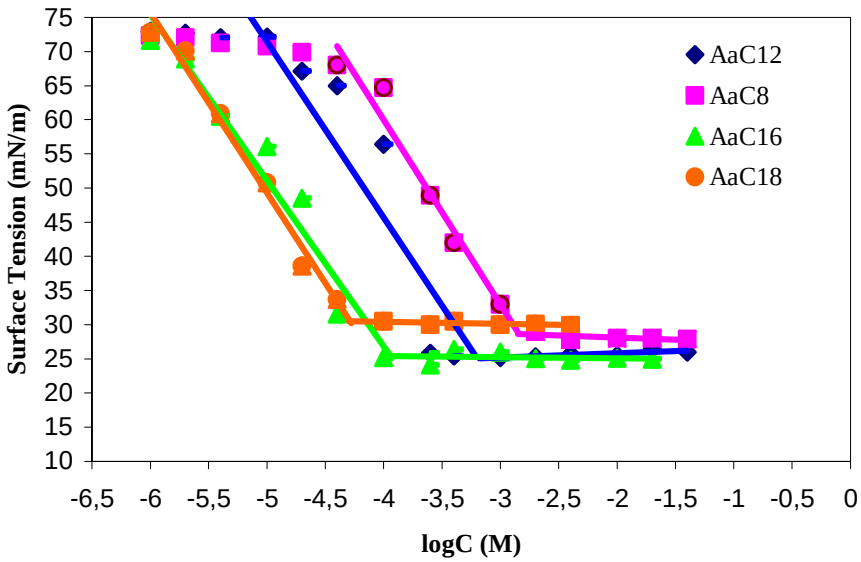


Figure 1. CAC determination with Wilhelmy-plate method of AaCn

At room temperature, all the synthesized compounds lower the surface tension of water to about 30 mN/m, which is a classical behaviour for hydrogenated surfactants. Depending on the product, the CAC ranges from 10^{-3} to 10^{-5} M. CAC of the surfactant decreases with increasing alkyl chain length. When the length of the chain increases by two CH_2, the CAC values decrease by a factor of *ca*. 4, which is in good agreement with results described for cationic hydrogenated surfactant (Berthod, 1983). Comparatively, the CACs of alkyl ammonium ascorbates are smaller than those of alkylammonium chlorides (about 10^{-3}M) (Fuersteman, 1991), but similar to that of ascorbyl alcanoates (8 10^{-4}M) (Palma, 2002).

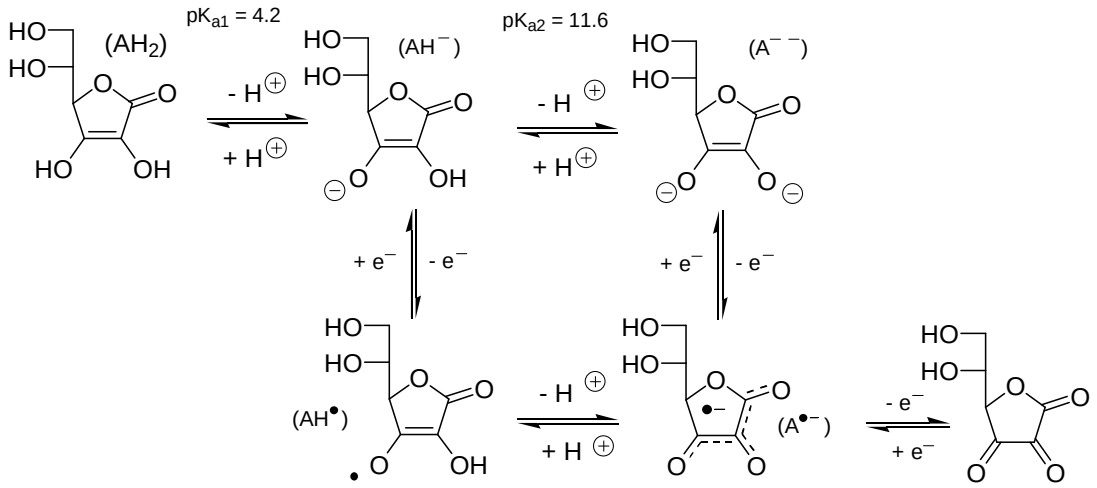
3.3. Antioxidant properties

The antioxidant properties of ascorbic acid and of its salts are shown in table 2.

Table 2. Antioxidant properties of ascorbic acid and its ascorbate salts

Antioxidant	τ (min)	IC_{50} (μmol/l)
Ascorbic acid	52	20.3
AaC_8	50	53.4
AaC_{12}	58	63.6
AaC_{16}	44	44.8
AaC_{18}	62	40.7

It is obvious from these results that alkyl ammonium ascorbate salts as ascorbic acid are able to slow down oxidation of methyl linoleate induced by AIBN. Inhibition oxidation periods (τ) of the different compounds are relatively close (44 to 62 min). Due to the values of inhibition period measured, it seems however difficult to evaluate more precisely the effect of the size of the alkyl chain. Some ascorbate salts possess slightly higher antioxidant properties than ascorbic acid, while others possess slightly lower properties. The DPPH assay allows determination of IC_{50} value corresponding to the concentration at which 50% of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical is scavenged. A lower IC_{50} value corresponds to a larger scavenging activity. As shown in table 2, ascorbic acid possesses higher radical scavenging activity in comparison to the different ascorbate salts. IC_{50} value of ascorbic acid is similar to that reported (Mazor et al., 2006) in the literature (compare 20.3 to 20.8), while those of the ascorbate salts are close to 45 except in the case of AaC_{12}, which presents lower radical scavenging activity. Even if the exact effect of the size of the alkyl chain remains unclear, it is obvious from these results that fatty ammonium salts of ascorbic acid possess antioxidant properties. According to literature (Njus, 1991), ascorbic acid (AH_2) commonly reacts as an electron donor to yield a free radical ($AH^{\cdot}$) or a radical anion ($A^{-\cdot}$) leading to dehydroascorbic acid as final oxidation product. The formation of the radical anion ($A^{-\cdot}$) is facilitated through its stability attributed to its pseudo-aromaticity (Abe , 1987). Oxidation processes are reported in scheme 2.



Scheme 2. Mechanism of oxidation of ascorbic acid

According to the mechanism of oxidation, it is not surprising that ascorbate salts are able to scavenge both AIBN initiated radicals as well as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical. Because pK_{a2} is 11.6, the dianion is an exceedingly small fraction of total ascorbate in solution. However, the stability of the radical anion ($A^{-\cdot}$) shifts the equilibrium to the right. The lower antioxidant properties of ascorbate salts observed in the DPPH assay could be due to the higher steric hindrance of alkyl ammonium ascorbate salts in comparison to ascorbic acid reducing

electronic transfer with hindered 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical. Another explanation may be as follows. As scheme 2 shows, ascorbic acid may give up two H atoms to DPPH. The hydroxylic H atom in position 3 is no longer present in modified acids, which might result in an IC_{50} twice as large as the ascorbic acid IC_{50}, in agreement with our observations. This effect is not observed in the oxygen uptake method, but it has been shown that correlation between the two methods is poor (Diouf, 2006).

3.4. Effect of ascorbate salts on fungal growth

To evaluate the effects of ascorbate salts on fungi, growth inhibition tests were investigated. Growth inhibition assays were carried out with *Coriolus versicolor* on malt agar medium using different concentration of salts. Fungal development was estimated every day by measuring the diameter of the mycelium and growth inhibition values recorded after total colonization of the control Petri dishes (approximately 10 days). Results are presented in figure 2.

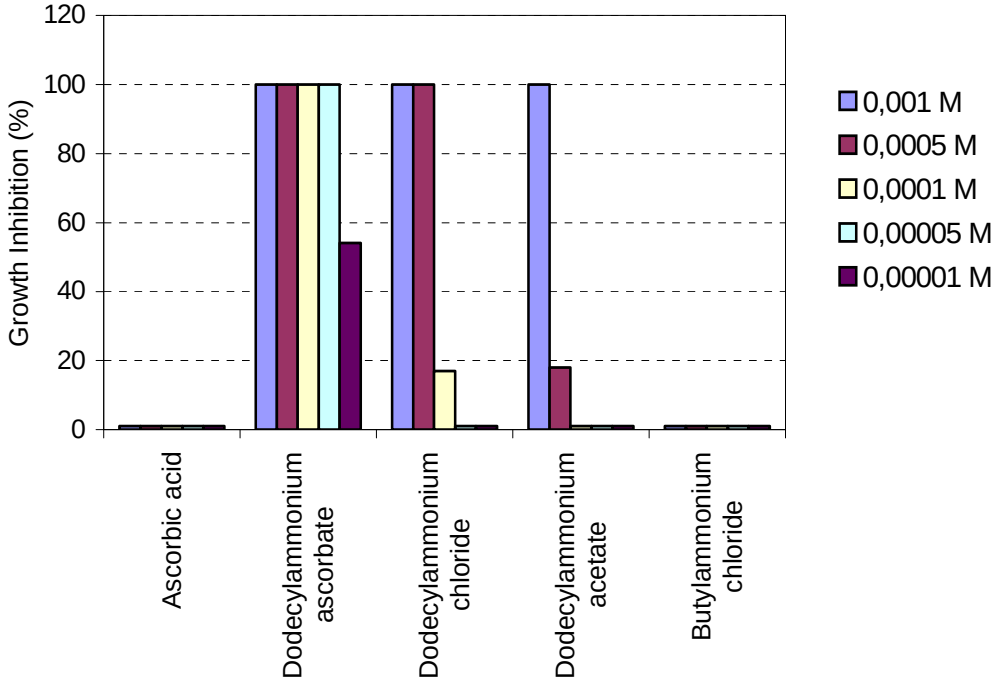


Figure 2. Effect of different ammonium salts on mycelium growth

It is obvious from these results that amphiphilic ascorbate salts are able to inhibit fungal growth. Growth inhibition is important in the case of dodecylammonium ascorbate (AAC12), while butylammonium ascorbate like butylammonium chloride, which have been shown to have no surfactant properties, are unable to inhibit *Coriolus versicolor* growth. Substitution of ascorbate moiety by an acetate or a chloride counter ion decreased inhibitory effect. Ascorbic acid tested alone has no effect on mycelium development. According to these results, it seems that amphiphilic properties of cationic surfactant is at the origin of fungicidal properties of AAC12. Indeed, surfactants like quaternary ammonium are well known for their ability of disrupting cell membranes (Donnell et Russel, 1999; Carmona et al 2006). Moreover, cationic surfactants have been reported to be able to carry antibiotics, drugs, genes, or antigens through biological membranes exhibiting sometimes synergic effects with the drug carried or displaying anti-infective properties by themselves (Carmona et al 2006). Similarly to these results, it can be postulated that dodecylammonium ascorbate interferes with the membrane of the fungi leading to disorganization of this latter one inhibiting thus fungal development.

3.5. Application to wood preservative formulation

Behavior of the AaC12 salt was then investigated in aqueous formulation of propiconazole, a widely used fungicide for wood preservation. The advantage of AaC12 compared to traditional surfactants lies in the fact that not only can it solubilize insoluble organic compounds in water, but it also exhibits some antioxidant properties likely to increase biological properties of propiconazole through synergistical or additive effects. AaC12 salt, ascorbic acid and dodecylamine hydrochloride were also tested alone to evaluate their effect on fungal development. Impregnated wood blocks were exposed to *Coriolus versicolor*, a wood rotting fungus, for 16 weeks and effect of the treatment was evaluated according to wood weight losses due to fungal attack. Results are presented in figure 3. A statistical analysis of data of the figure (one-way analysis of variance) using the JMP program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) allows to class results in five categories from A to E as indicated on figure 3. Systems not connected by the same letter are largely different, at the 5% level.

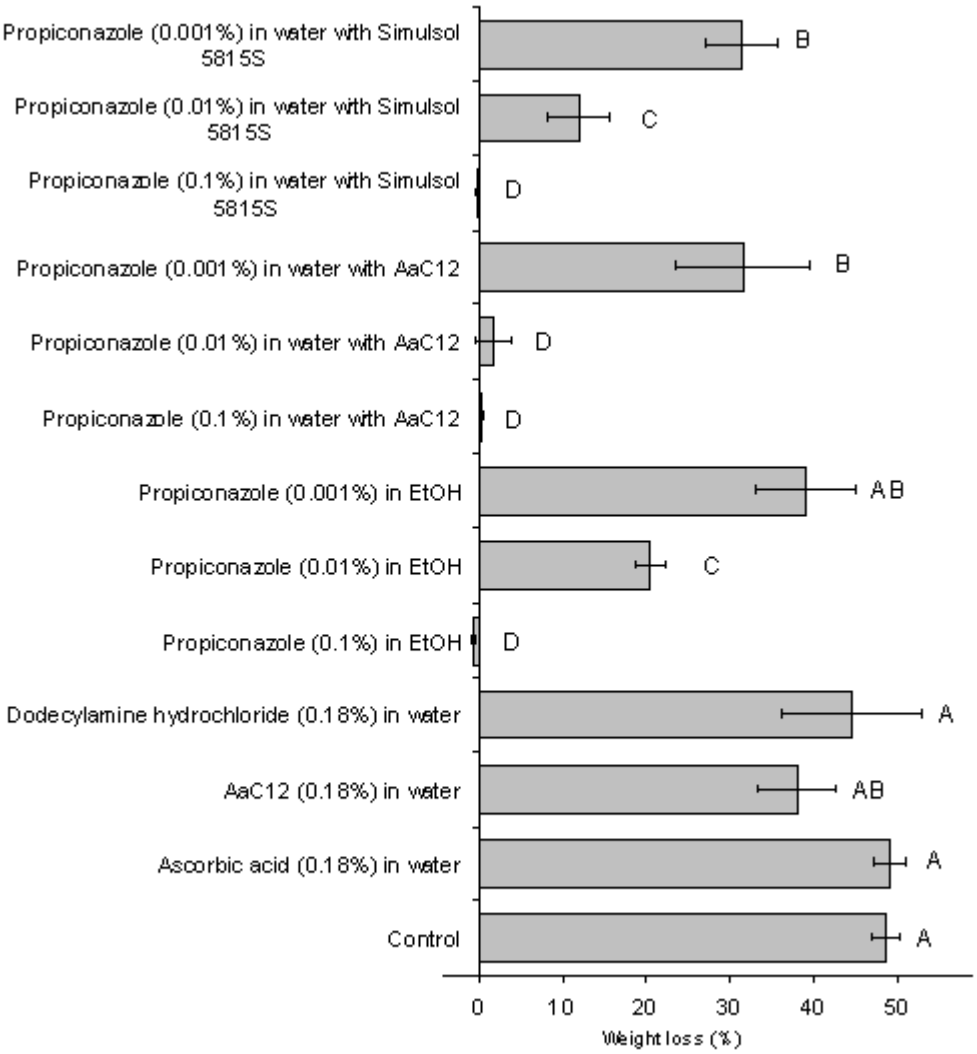


Figure 3. Evolution of weight losses of wood samples impregnated with the different formulations exposed to *Coriolus versicolor*. Error bars represent standard deviations. Systems not connected by the same letter are largely different, at the 5% level

At 0.001% propiconazole concentration, aqueous formulations show higher efficiencies compared to the ethanolic solution. At 0.01% concentration, propiconazole formulated with AaC12 presents the highest efficiency. No weight loss was observed for blocks treated at 0.1% of propiconazole, whatever the formulation used. The effect of antioxidant properties is more difficult to evaluate. Depending on the concentration of propiconazole, a small effect could be observed or not. However, the significance of this effect is low and must be confirmed by additional experiments. Effect of ascorbic acid, dodecylamine hydrochloride and AaC12 at concentrations similar to that of surfactants in the tested formulations was also investigated. In all cases, wood blocks were strongly degraded indicating no effect of these compounds at the tested concentrations. These results clearly demonstrate that ascorbate salts behave as classical surfactants. They have been shown to possess interesting antioxidant properties during methyl linoleate oxidation and DPPH assays, hence could be of valuable interest to formulate active substances sensitive to oxidation reactions.

4. CONCLUSION

New surfactants are easily obtained from ascorbic acid and fatty amines. These compounds behave as traditional cationic surfactants and possess antioxidant properties. Surfactant properties of alkyl ammonium ascorbates are strongly influenced by the length of the fatty alkyl amine used, while effect of the chain length on the antioxidant properties is less obvious. Amphiphilic ascorbate salts possess strong inhibitory effect on fungal growth when tested against *Coriolus versicolor* on malt agar medium. At the same time, butylammonium ascorbate has now effect indicating that surfactant properties are crucial for fungicidal activity. Propiconazole formulated in aqueous solution with dodecylammonium ascorbate show improved activity compared to propiconazole used at the same concentration in ethanol. Reasons of this behavior are not clear, but could be due to a higher penetration of the biocide in the wood structure leading to a higher concentration of propiconazole or to a better fungicidal activity due to the presence of surfactant. Comparatively to formulations realized with conventional surfactant like Simulsol, the use of amphiphilic antioxidant ascorbate salts, gives a slight increase protection provided to beech wood against *Coriolus versicolor*. Further experiments are currently under investigation to more precisely evaluate the potentiality of such surfactants.

5. REFERENCES

Abe Y., Okada S., Horii H., Taniguchi S., Yamabe S. (1987). A theoretical study on the mechanism of oxidation of L-ascorbic acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*. 715-720.

Aury S., Rubini P., Gérardin C., Selve C. (2004). Amphiphilic amide derivatives of D-glucaric acid. Synthesis and complexing properties toward lanthanide(III) ions. *Eur. J. Org. Chem*. 9, 2057-2066

Bakhsous B., Dumarçay S., Gelhaye E., Gérardin P. (2006). Investigation of new wood preservation formulations based on synergies between antioxidant, 2-HPNO and Propiconazole. IRG/WP 06-30401

Baya, M., Souloungangа, P., Gelhaye, E., Gérardin P. (2001) Fungicidal activity of β-thujaplicin analogues. *Pest. Manag. Sci.* 57, 833-838.

Berthod A. (1983) *Journal de Chimie Physique* 80 : 407

Capuzzi G., Lo Nostro P., Kulkarni K. and Fernandez J.E. (1996). Mixtures of stearoyl-6-O-ascorbic acid and α-tocopherol: A monolayer study at the gas/water interface. *Langmuir*, 12:3957-3963.

Capuzzi G., Lo Nostro P., Kulkarni K., Fernandez J.E. and Vincieri F. F. (1996). Interactions of 6-o-stearoylascorbic acid and vitamin K1 in mixed Langmuir films at the gas/water interface**.** *Langmuir* 12:5413-5418.

Capuzzi G., Kulkarni K., Fernandez J.E., F. F. Vincieri and P. Lo Nostro, (1997). Mixtures of ascorbyl-stearate and vitamin D3: A monolayer study at the gas/water interface. *J. Colloid. Interface Sci*. 186:271-279.

Carmona Ribeiro A.M., Vieira D.B.; Lincopan N. (2006). *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry.* Cationic surfactants and lipids as anti-infective agents. 5 (1) 33-54

Dikusar E.A., Kozlov N.G. and. Mel'nichuk L.A. (2004). Salts of L-ascorbic acid with certain substituted amines and triphenylphosphine. *Chemistry of Natural Compounds*, 40: 406-407.

Diouf P.N., Merlin A., Perrin D. (2006) Antioxidant properties of wood extracts and colour stability of woods. *Ann.For Sci*. 63 525-534.

Ella-Menye J. R., Sharma V., Wang G. (2005). New Synthesis of Chiral 1,3-Oxazinan-2-ones from Carbohydrate Derivatives. *J. Org. Chem*. 70, 463-469.

Emmanouil V., El Ghoul M., André-Barrès C., Guidetti B., Rico-Lattes I., Lattes A. (1998). Synthesis of New Long-Chain Fluoroalkyl Glycolipids: Relation of Amphiphilic Properties to Morphology of Supramolecular Assemblies. *Langmuir*, 14, 5389-5395.

Fuersteman D.W., Herrera-Urbina R., in Surfactants Sciences Series 37, Cationic surfactants, Rubingh D.N., Holland P.M. Ed, Marcel Dekker, New York (1991) 415.

Hammel, K.E. (1997) Fungal degradation of lignin. CAB International Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition. Eds Cadisch, G. and Giller, K.E. 33-45.

Kerem, Z., Jensen, K.A., Hammel, K.E. (1999) Biodegradative mechanism of the brown rot basidomycete *Gloephyllum trabeum*: Evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. *FEBS Letters* 446, 49-54.

Lo Nostro P., Capuzzi G., Romani A., Mulinacci N. (2000). Self-assembly and antioxidant properties of octanoyl-6-O-ascorbic acid. *Langmuir*, 16 :1744-1750.

Lo Nostro P., Capuzzi G., Pinelli P., Mulinacci N., Romani A., Vincieri F.F. (2000). Self-assembling and antioxidant activity of some vitamin C derivatives. *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects* 167: 83-93.

Mabicka, A., Dumarçay, S., Gelhaye, E., Gérardin, P. (2004) Inhibition of fungal degradation of wood by 2-hydroxypyridine-*N*-oxide. *Holzforschung* 58, 566-568.

Mazor D., Greenberg L., Shamir D., Meyerstein D., Meyerstein N. (2006) Antioxidant properties of bucillamine: Possible mode of action. *Biochem. Bioph. Res. Co*., 349 1171-1175.

Mc Donnell G., Russel D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 12 (1), 147-179

Njus D., Jalukar V., Zu J., Kelley P. M. (1991). Concerted proton-electron transfer between ascorbic acid and cytochrome b561. Am. J. Clin. Nutr. 54 1179S-1183S.

Palma S., Nostro P.Lo, Manzo R., Allemandi D. (2002). Evaluation of the surfactant properties of ascorbyl palmitate sodium salt. Eur. J. Pharm. Sci. 16 37-43.

Schultz, T.P. and Nicholas, D.D. (2000) Naturally durable heartwood: evidence for the proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry* 54, 47-52.

Schultz, P. and Nicholas, D.D. (2002) Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. *Phytochemistry* 61, 555-560.

Suttie, E.D., Orsler, R.J., Wood, P.M. (1996) Preliminary studies of the performance of iron chelators as inhibitors of brown rot (*Coniophora puteana*) attack. *International Research Group on Wood Preservation* IRG/WP-10185.