

L'UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Ecole doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 1

Spécialité : Molécules et matière condensée

Par

Delphine BLONDÉ

**ETUDE MECANISTIQUE DE LA GENERATION DE VOLATILS ISSUS
DES DEGRADATIONS THERMIQUE ET CATALYTIQUE DES
HYDROPEROXYDES DE SQUALENE ET DERIVES**

Thèse co-dirigée par :

Pr. Véronique NARDELLO-RATAJ et Pr. Jean-Marie AUBRY

Soutenue le 28 Novembre 2013

Devant le jury composé de :

Rapporteurs :

Dr. Elena Giménez-Arnau

Université de Strasbourg

Pr. Pierre Lantéri

Université Lyon 1

Examineurs :

Pr Stéphanie Delbaere

Université Lille 2

Dr. Craig Jones

Société Unilever Port Sunlight

Dr. Cécile Cren-Olivé

Université Lyon 1

Directeurs :

Pr. Véronique Nardello-Rataj

Université Lille 1

Pr. Jean-Marie Aubry

Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire « Oxydation et physico-chimie de la Formulation », « équipe d'accueil Chimie Moléculaire et de Formulation » (EA. 4478), sous la direction du Pr. Jean-Marie Aubry.

Mes premiers remerciements sont destinés au *Pr. Jean-Marie Aubry*, co-directeur de cette thèse. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux au sein de votre laboratoire. Je vous suis reconnaissante d'avoir cru en mes capacités de chercheuse. Merci pour vos conseils constructifs et votre accompagnement qui m'ont permis d'évoluer et de progresser dans cette voie.

Merci au *Pr. Véronique Nardello-Rataj*, directrice de cette thèse, pour ses conseils et son accompagnement durant ces trois années. Tu as su rester patiente et compréhensive et voir que la recherche n'était pas innée chez moi. Tu m'as soutenue lors de ma rédaction qui n'a pas été évidente. Sans toi, ce travail et ce manuscrit ne seraient pas ce qu'ils sont ! Merci.

Mes sincères remerciements au *Dr. Elena Giménez-Arnau*, de l'Université de Strasbourg, et au *Pr. Pierre Lantéri*, de l'Université Lyon 1, rapporteurs, pour le temps accordé à la lecture de ce manuscrit et l'évaluation de ce travail. Je souhaite remercier le *Pr. Stéphanie Delbaere*, de l'Université Lille 1, le *Dr Craig Jones*, de la société Unilever, ainsi que le *Dr. Cécile Cren-Olivé*, de l'Université Lyon 1, pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineurs.

Merci au *Dr. Craig Jones*, de la société Unilever, encadrant industriel de cette thèse, pour la confiance qu'il m'a accordé. Vos encouragements ont été un moteur essentiel dans l'avancement de ces travaux. J'espère avoir été à la hauteur de ce que vous attendiez de ces trois années de thèse.

Je souhaite également remercier le *Dr. Andrew Dowd* et le *Dr. Dave Thornthwaite* pour leur contribution à la réalisation de ces travaux. Par ailleurs, j'adresse un merci particulier au *Dr. Katherine Thompson* pour son accueil et sa disponibilité à chacun de mes séjours au sein des laboratoires de Portsunlight.

Merci au *Pr. Stéphanie Delbaere*, au *Dr. Caroline Tokarski* et au *Dr. Frédéric Cazaux* pour leur aide et leur contribution à la réalisation des expériences en RMN, en spectrométrie de masse et en ATG. Merci à l'équipe d'Alyxan, notamment *Hubert Latappi* et *Julien Leprovost*, pour leur disponibilité et leur sympathie lors de la réalisation des expériences de spectrométrie de masse B-trap.

Cette thèse m'a également permis de faire de belles rencontres. Merci au *Dr. Valérie Molinier*, au *Dr. Christel Pierlot* et au *Dr. Loïc Leclerc*, maîtres de conférences, pour tous les moments de partage et de discussions que l'on a pu avoir, que ce soit lors des pauses café, de la chimie itinérante ou improvisés au détour d'un couloir. Je remercie également *Christophe Penverne*, ingénieur d'étude, pour s'être rendu disponible et m'avoir aidée et secondée dans la réalisation de certaines de mes expériences.

Je tiens à adresser un merci particulier au *Dr. Raphael Lebeuf*, maître de conférences, qui a su se rendre disponible tout au long de ses trois années. Grâce à toi la chimie organique est devenue accessible voir même sympathique. Tu as su être à l'écoute et prendre le temps de m'aider même si tu n'étais pas lié au sujet.

Le laboratoire EACMF, c'est aussi de nombreux doctorants et docteurs, collègues et amis : Merci à *Adrien Mouret* pour ta gentillesse : toujours prêt à rendre service et à faire plaisir. Merci à mon voisin de paillasse, *Adrien Benazzouz* pour les discussions autour de la balance ! Gracias *Fermin Ontiveros* pour les bons moments partagés notamment lors du traitement des déchets et de la recherche de solvants. Merci au *Dr. Marion Collinet* pour ses conseils avisés et son amitié spontanée et sans préjugés. Je n'oublierai pas de remercier également le *Dr. Morgan Durand*, *Thomas Lukowicz* (Danke !) et *Bing Hong* (謝謝) pour ses années partagées.

Parce que durant 2 mois et demi j'étais sur « l'île », un chaleureux merci à toute l'équipe de Portsunlight (Liverpool) pour leur accueil et pour m'avoir toujours fait sentir que je faisais pleinement partie d'Unilever. Merci particulièrement à *Ilaria Sambì* ainsi qu'à *Bastien Hamounic*.

Enfin, merci à mes supers collègues du bureau 17 ! Merci au *Dr. Aurélie Lavergne* pour ton accueil et tes conseils lors de ma première année de thèse. Mais surtout, Danke *Andréa Muehlbauer* et gracias *Roberto Company* pour tous les bons moments que nous avons partagés pendant deux ans ! En sandwich entre vos deux bureaux, mes journées étaient rigoureusement ensoleillées ! Ensemble, nous avons ri, nous nous sommes plaints, mais surtout nous nous sommes relayés...Merci pour toutes ces discussions, votre soutien et votre bonne humeur !

Malgré tout, l'amitié reste le maître mot de ces trois années. Pour cela, merci au *Dr. Clémentine Marteau* et au *Dr. Laurianne Moity* ! Les mots ne sont pas grand-chose face à tous ces moments partagés à potiner, à rire mais aussi parfois à pleurer. Je vous dois beaucoup, sans vous, ces trois ans n'aurait pas eu la même « fragrance ». Vous avez toujours su trouver les mots justes pour me reconforter et m'aider à ne pas lâcher. Au-delà de tout, la plus belle chose que m'est apportée cette thèse est sans nul doute votre amitié.

Un immense merci à ma famille mais également à tous mes amis aussi loin de la chimie soient ils. Les moments passés avec vous en dehors du laboratoire m'ont apporté le réconfort nécessaire à affronter les durs moments que j'ai pu traverser. Un grand merci en particulier à ma meilleure amie, *Anna*. Malgré ton aversion pour la chimie tu as été une confidente hors pair, acceptant avec une grande patience de m'écouter des heures durant. Je t'ai toujours sentie à mes côtés, à m'épauler, et me booster !

Parce que sans lui je ne serai pas là, le dernier et le plus important des remerciements revient sans nul doute à mon compagnon, *Matthieu*. Cette thèse je l'ai faite pour toi. C'est auprès de toi que j'ai su trouver la force d'avancer, dans tes yeux que j'ai trouvé la confiance nécessaire pour réaliser ce projet. Tu as toujours été là pour me reconforter, me soutenir et me supporter durant ces trois années. Merci pour ta patience, d'avoir cru en moi et d'être aussi fière de moi. Sache que tu es LA raison de cette thèse. Si aujourd'hui j'ai réussi à aller jusqu'au bout c'est pour toi et grâce à toi. Pour tout, Merci.

Résumé

La principale source de salissures grasses sur les textiles est le *sébum humain*. Celui-ci est un mélange complexe contenant 12% de *squalène*, un triterpène facilement oxydable du fait de la présence de six doubles liaisons trisubstituées. Son oxydation par l'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), conduit à la formation d'hydroperoxydes dont la décomposition libère une odeur agréable, mélange de miel et de caramel. L'objectif de l'étude était d'élucider les mécanismes mis en jeu lors de la thermolyse des hydroperoxydes. Il s'agissait d'une part de détecter et d'identifier les produits d'oxydation primaires (hydroperoxydes) et secondaires (volatils) formés et d'autre part, d'étudier les paramètres (*température, catalyseurs métalliques, enzymes*) permettant d'exalter la production de composés volatils.

Le squalène a été oxydé par $^1\text{O}_2$, engendré *photochimiquement* ou *chimiquement* par dismutation du peroxyde d'hydrogène catalysée par les ions molybdates. Malgré la complexité du milieu réactionnel et la fragilité intrinsèque des hydroperoxydes formés, la mise au point d'une méthode analytique douce par *spectrométrie de masse* utilisant la technique d'ionisation par *électronebullisation (ESI-Qq-TOF)* et le *lithium* comme *agent dopant*, a permis de détecter six familles d'hydroperoxydes, notés $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ avec $n = 1$ à 6, résultant de la peroxydation successive des doubles liaisons du squalène. Il a ainsi été montré que les produits issus de la photooxydation sont de même nature que ceux issus de l'oxydation chimique et que les hydroperoxydes secondaires et tertiaires se forment en proportions équivalentes.

Dans un second temps, la dégradation thermique des hydroperoxydes de squalène en fonction de leur degré de peroxydation a été étudiée en recourant à la *spectrométrie de masse FT-ICR* utilisant un *analyseur B-trap*. Cette étude a permis de détecter et d'identifier 9 volatils, et de montrer que l'acétone est le composé majoritairement formé (23 et 80% selon le degré de peroxydation). La décomposition thermique des hydroperoxydes de squalène résulte d'un mécanisme en deux étapes : formation des radicaux alcoyles RO^\bullet et peroxydes ROO^\bullet suivi des α et β -scissions produisant des *aldéhydes*, des *alcools* et des *cétones*.

Enfin, l'activité catalytique de deux complexes ferreux à base de ligands pentadentés, le $\text{Fe-MeN}_4\text{Py}$ et Fe-bispidone , a été évaluée sur la dégradation des hexahydroperoxydes de squalène. Les mêmes composés volatils que ceux engendrés par thermolyse à 80°C sont alors formés, mais à température ambiante. L'utilisation des complexes ferreux ouvre donc des perspectives quant à l'exaltation de la dégradation des hydroperoxydes de squalène éventuellement formés lors des étapes de la détergence.

Mots clés : *Squalène, terpènes, terpénoïdes, dégradation oxydante, peroxydation, oxygène singulet, hydroperoxyde, volatils, RMN, spectrométrie de masse ESI-Qq-TOF, dopage au lithium, spectrométrie de masse FT-ICR, analyseur B-trap, catalyseurs ferreux, ligand pentadenté*

Abstract

Title: STUDY OF VOLATILE GENERATION MECHANISMS OF THERMAL AND CATALYTIC DEGRADATIONS OF HYDROPEROXIDES OF SQUALENE AND DERIVED COMPOUND

The main source of fatty soils on fabrics is human sebum. It is a complex mixture including approximately 12% squalene, a triterpene easily oxidizable due to the presence of six unsaturated groups. Oxidation by singlet oxygen, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), leads to formation of hydroperoxides, whose decomposition releases a more pleasant odour, similar to a mixture of honey and caramel.

The aim of this study was to use the oxidative degradation of squalene for applications in detergency to clarify the mechanisms involved. One goal was to detect and identify the primary oxidation products (hydroperoxides) and the secondary products (VOCs) and the other, to study parameters (temperature, metal catalysts, enzymes) which can impact on volatile production. Squalene has been oxidized by singlet oxygen produced using a photochemical method and a chemical route, by decomposition of hydrogen peroxide catalyzed by molybdate ions. Despite the complexity of the medium and the intrinsic fragility of performed hydroperoxides, the development of a soft analytical method by mass spectrometry using ionization by electrospray (ESI-Qq-TOF), with lithium, has allowed detection of six hydroperoxide families, written $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ with $n = 1$ to 6, from successive peroxidations of squalene double bonds. Thus, it has been shown that products from photooxidation or chemical oxidation are the same and that secondary and tertiary hydroperoxides are performed in equal quantities.

In a second part of the study, the thermal degradation of squalene hydroperoxides with different degrees of peroxidation has been studied by mass spectrometry FT-ICR using a B-trap analyzer. 9 volatiles have been detected and identified including acetone as the major component (23 to 80% according the peroxidation degree). The thermal degradation of squalene hydroperoxide results from a two-step mechanism: alkoxy radical (RO^\bullet) and peroxy radical (ROO^\bullet) formation followed by α and β scissions releasing aldehydes, alcohols and ketones.

Finally, two ferrous complexes have been evaluated for their abilities to catalyse squalene hexahydroperoxide degradation. The same volatiles as those detected by thermolysis have been released in the presence of the catalytic bleaching agents, but with the same kinetics at room temperature as observed at 80°C in the absence of the catalysts. The use of ferrous complexes opens the prospect of enhancing and better controlling squalene hydroperoxide degradation during detergency processes.

Key words : *Squalene, terpenes, terpenoids, oxydative degradation, peroxidation, singlet oxygen, hydroperoxide, volatiles, NMR, mass spectrometry ESI-Qq-TOF, lithium, mass spectrometry FT-ICR, analyzer B-trap, ferrous catalyst, pentadentate ligand*

Listes des abréviations, produits et symboles

Abréviations

APT	Test du Proton Attaché
CCM	Chromatographie Couche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
COSY	COrrélation SpectroscopY
COV	Composé Organique Volatil
DFT	Density Functional Theory
DOSY	Diffusion Ordered SpectrometrY
ECS	Electrode de calomel saturée
ESI-MS	Electrospray Ionization - Mass Spectrometry
et al.	et alii
FID	Flame Ionization Detector
CG / GC	Chromatographie Gazeuse
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
SM	Spectrométrie de Masse
MS-FTICR	Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
QTOF	Quadrupole Time-Of-Flight
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
R_f	Facteur de rétention
SPME	Solid-Phase Micro Extraction
s_a	Singulet apparent
t_a	Triplet apparent
UV	Ultra-violet

Produits – Composés chimiques

Bispidine	3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonanone
¹³C	Carbone-13
CDCl₃	Chloroforme deutéré
CLA	Conjugated linoleic acid
DGS	Succinate de digéranyle
Fe-bispidone	Complexe à base de fer(II) porteur d'un ligand bispidone
Fe-MeN₄Py	dichlorure de Fer(II) N,N-Bis(pyridine-2-yl-methyl)-1,1-bis(pyridine-2-yl)-1-amino-éthane
¹H	Proton-1

HPO-Lyase	Hydroperoxide-Lyase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HO[•]	Radical hydroxyle
LOX	Lipoxygénase
LH	Liquide
L[•]	Radical lipidique
LO[•]	Radical lipidique alcoxyle
LOO[•]	Radical lipidique peroxyde
LOOH	Hydroperoxyde lipidique
MeOH	Méthanol
N₄Py	(N,N-bis(2-py-tris(2-pyridylmethyl)-N-bis(2-pyridyl)methylamine
Na₂MoO₄	Molybdate de sodium
¹O₂	Oxygène singulet
O₂^{•-}	Anion radicalaire superoxyde
Pt	Platine
S/S₀	Sensibilisateur / sensibilisateur dans son état fondamental
ⁿS*	Sensibilisateur dans son état excité de niveau n
SQ	Squalène
SQ(OOH)_n	Hydroperoxyde de squalène peroxydés n fois
TBATFB	Tétraabutylammonium tétrafluoroborate
THF	Tétrahydrofurane
TPP	Tétraphénylporphirine

Symboles

C	Concentration
°C	Degré celsius
E^o	Potentiel chimique ou potentiel redox (en Volt)
D	Moment dipolaire
Δ	Chaleur
h	Constante de Planck $h = 6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s
L	Ligand
L_{4N}	Ligand tétradenté (4 atomes N reliés au noyau Fe ^{II})
L_{5N}	Ligand pentadenté (5 atomes N reliés au noyau Fe ^{II})
M	Masse moléculaire en g.mol ⁻¹ ou molaire en mol.L ⁻¹
min	minute
mol	mole
mg	milligramme
mL	millilitre
μL	microlitre

mV	millivolt
m/z	Rapport masse sur charge
n	Degré de peroxydation
v	Rayonnement de fréquence
λ	Longueur d'onde (nm)
ppm	Partie par million
T	Température (°C)
V	Volt

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre I : Peroxydation et dégradation oxydante des acides gras insaturés : Etat de l'art	
Introduction	23
I.1. Oxydation des acides gras insaturés : Etat de l'art	25
<i>I.1.1. Les acides gras : analyse bibliométrique</i>	25
<i>I.1.2. Oxydation des acides gras insaturés</i>	26
I.1.2.1. Oxydation par l'oxygène moléculaire 3O_2	26
I.1.2.2. Oxydation catalysée par les enzymes	27
I.1.2.3. Oxydation catalysée par des métaux	28
I.2. Autoxydation des acides gras insaturés	30
<i>I.2.1. Mécanisme d'autoxydation</i>	30
<i>I.2.2. Acides oléique, linoléique et linoléique</i>	33
<i>I.2.3. Facteurs influençant l'autoxydation des lipides</i>	36
I.3. Oxydation des lipides par l'oxygène singulet	38
<i>I.3.1. L'oxygène singulet 1O_2</i>	38
I.3.1.1. Formation de l'oxygène singulet par voie photochimique	38
I.3.1.2. Réactivité de l'oxygène singulet en présence de composés insaturés	40
<i>I.3.2. Oxydation des acides gras insaturés par voie photochimique</i>	42
I.4. Dégradation des acides gras peroxydés	46
<i>I.4.1. Initiation des radicaux $LOO\cdot$ et $LO\cdot$</i>	46
<i>I.4.2. Propagation des radicaux $LOO\cdot$ et $LO\cdot$</i>	47
I.4.2.1. Transfert d'atome et arrachement d'un hydrogène	47
I.4.2.2. Fragmentation par α - et β - scissions	48
I.4.2.3. Réarrangement ou cyclisation	50
I.4.2.4. Addition sur une double liaison (réticulation)	52
I.4.2.5. Dismutation ou auto recombinaison radicalaire de $LOO\cdot$	53
<i>I.4.3. Principaux produits formés</i>	53
I.4.3.1. Produits issus de la thermolyse des produits primaires d'oxydation	53
I.4.3.2. Produits issus de la thermolyse des produits secondaires d'oxydation	56

I.5. Catalyse oxydative des acides gras insaturés	57
<i>I.5.1. Initiation directe</i>	57
I.5.1.1. Via des métaux à haute valence	57
I.5.1.2. Via des métaux à faible valence	58
<i>I.5.2. Initiation indirecte via des complexes hypervalents métal-oxygène</i>	59
I.6. La voie enzymatique	61
<i>I.6.1. Présentation, mode d'action et mécanisme des enzymes</i>	61
I.6.1.1. Présentation des enzymes	61
I.6.1.2. Mode d'action des enzymes	62
I.6.1.3. Mécanisme des enzymes	62
<i>I.6.2. La lipoxygénase (LPO)</i>	64
<i>I.6.3. L'hydroperoxyde-lyase</i>	66
I.6.3.1. Présentation et mécanisme d'action de l'hydroperoxyde-lyase (HPO-lyase)	66
I.6.3.2. Dégradation homolytique des hydroperoxydes par HPO-lyase	67
I.6.3.3. Clivage hétérolytique par l'hydroperoxyde lyase	67
I.6.3.4. Inhibition de l'hydroperoxyde-lyase	70
Conclusion	71
Références bibliographiques du chapitre 1	73

Chapitre II: Peroxydation du squalène et dégradation des hydroperoxydes en molécules volatiles

Analyse bibliométrique de la littérature relative à l'oxydation du squalène	87
II.1. Oxydation du squalène : formation des hydroperoxydes	91
Degradative oxidation of squalene part 1. Stepwise Polyperoxidation of Squalene by Chemically and Photochemically Generated Singlet Oxygen 1O_2 ($^1\Delta_g$)	
II.2. Thermolyse des hydroperoxydes de squalène	121
Degradative oxidation of squalene part 1. Formation of Volatiles Released from the Thermal Decomposition of Squalene Hydroperoxides issued from Singlet Oxygenation	
<i>Complément 1 : dégradation du squalène peroxydé suivie par CGP</i>	152
II.2.1.1. Calibration des temps de rétention en CG	152
II.2.1.2. La SPME (Solid-Phase MicroExtraction)	153
II.2.1.3. Analyse « headspace » des produits de dégradation des SQ(OOH) _n	153

Chapitre III : Peroxydation des terpènes et terpénoïdes, sous-structures du squalène, et dégradation thermique des hydroperoxydes

Introduction 163

Publication : *MS-FTICR analysis of volatiles released by thermolysis of singlet oxygenated terpenoids* 167

Chapitre IV : Dégradation des hydroperoxydes de squalène par voies catalytique et enzymatique

Introduction 219

IV.1. Dégradation des hydroperoxydes de squalène par voie catalytique 220

IV.1.1. Introduction 220

IV.1.2. Etat de l'art des complexes ferreux à hauts degrés d'oxydation 222

IV.1.2.1. Bibliométrie des catalyseurs Fe^{2+} non héminique de type bispidine et N_4Py 222

IV.1.2.2. Influence du ligand sur la réactivité du catalyseur en présence d'oxydant 224

IV.1.2.3. Identification des espèces intermédiaires dans le processus d'oxydation d'un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}$ 227

IV.1.3. Présentation des catalyseurs utilisés : $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-MeN}_4\text{Py}$ et Fe -bispidone 231

IV.1.3.1. $\text{FeMeN}_4\text{pyCl}_2$ surnommé le « steel » **1** 231

IV.1.3.2. Le complexe $\text{Fe}(\text{Bispidone})\text{Cl}_2$ ou « stainless » 232

IV.1.3.3. Comportement des complexes ferreux **1** et **2** dans des solvants organiques : étude par voltampérométrie cyclique 234

IV.1.3.4. Détermination des coefficients d'extinction molaire de **1** et **2** et vérification de la loi de Beer-Lambert 238

IV.1.4. Etude du système $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-MeN}_4\text{Py} / \text{SQ}(\text{OOH})_6$ 241

IV.1.4.1. Détermination du ratio substrat/catalyseur 241

IV.1.4.2. Dosage des peroxydes au cours du temps en présence de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-MeN}_4\text{Py}$ 242

IV.1.4.3. Suivi par spectrométrie UV de l'oxydation du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-MeN}_4\text{Py}$ en présence des hydroperoxydes de squalène 244

IV.1.4.4. Conclusion : discussion des mécanismes 247

<i>IV.1.5. Dégradation des SQ(OOH)₆ en présence de Fe^{II}-bispidone et oxydation du complexe par les hydroperoxydes de squalène</i>	251
IV.1.5.1. Suivi par titration de la décomposition des hydroperoxydes en présence de Fe-bispidone	251
IV.1.5.2. Discussion des mécanismes d'oxydation du catalyseur, précurseur de la dégradation des hydroperoxydes de squalène	253
<i>IV.1.6. Identification des produits issus de la décomposition des SQ(OOH) en présence des catalyseurs Fe^{II}-MeN4Py et Fe-bispidone</i>	255
IV.1.6.1. Elaboration du protocole expérimental	255
IV.1.6.2. Quantification des produits issus de la décomposition catalytique des hydroperoxydes de squalène par Fe-MeN4Py et Fe-bispidone	256
IV.1.6.3. Mécanisme de dégradation des hydroperoxydes de squalène en présence de complexe ferreux	258
<i>IV.1.7. Conclusion générales des systèmes LFe^{II}/SQ(OOH)₆</i>	260
IV.2. Perspectives : dégradation des hydroperoxydes par voie enzymatique	263
IV.2.1. Présentation du projet	263
IV.2.2. Dégradation des hydroperoxydes par les 13-hydroperoxyde-lyases	264
IV.2.2.1. Essai de dégradation des hydroperoxydes de squalène par l'HPO-lyase	264
IV.2.2.2. Essai de l'enzyme E3647 sur les hydroperoxydes de squalène	265
Conclusion	267
Partie expérimentale	269
Références bibliographiques du chapitre 4	274
Conclusion générale	281

— Introduction générale

L'histoire de la détergence remonte à plus de 3000 ans lorsque les romains commencèrent à utiliser du savon pour se laver et nettoyer leurs vêtements. Les laveries publiques étaient appelées des « ateliers de foulons » (figure 1) et se composaient de grandes cuves creusées dans le sol dans lesquelles les habits étaient mis à tremper. Les employés « foulait » les vêtements et utilisaient de la terre de foulons ou terre-argile. Ce détergent permettait d'enlever le gras et de raviver les couleurs. L'urine humaine ou animale servait d'agent de blanchiment. La plus ancienne référence au savon remonte à 2800 av. J.C où des graisses et des cendres étaient utilisées comme base pour sa fabrication.¹

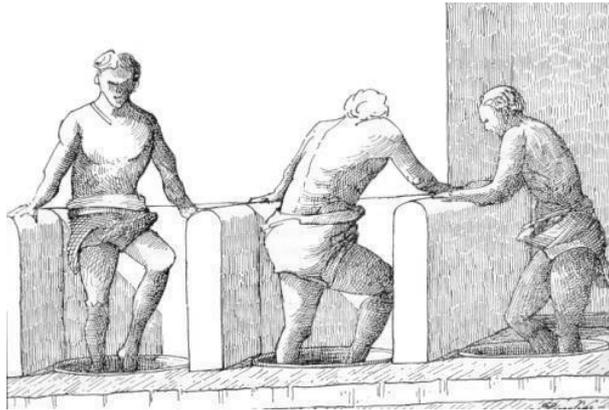


Figure 1 : Illustrations des « ateliers de foulons » à l'époque romaine.²

Il a fallu attendre les 15^{ème} et 16^{ème} siècles pour voir la France commencer à fabriquer du savon, mais ce n'est qu'au 17^{ème} siècle que les premières savonneries industrielles furent construites. D'abord obtenu à partir du suif de chèvre et de cendres de bouleau, le processus de saponification a ensuite été amélioré en remplaçant les graisses animales par des huiles végétales. Au fil des siècles, le savon resta l'unique produit détergent utilisé pour le lavage du linge. A la fin des années 1800, les ingrédients de base pour sa fabrication se composaient d'huile d'olive et de soude naturelle et celui-ci était considéré comme un produit de luxe.³

Le 19^{ème} siècle vit l'apparition des premières machines à laver mécaniques. Cette invention rendit le travail des lavandières moins pénible tandis que la saleté et les mauvaises odeurs qui accompagnaient la surpopulation des villes étaient de moins en moins acceptées. Cependant, ces évolutions techniques et sociétales ne s'accompagnaient pas d'une modification des produits détergents puisque jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle, on lavait encore son linge avec du savon en paillettes.¹



Figure 2 : William Hesketh Lever
(1851-1925)⁴

A la fin du XIX^{ème} siècle, le fondateur de *Lever Brother*, William Hesketh Lever (figure 2), eu l'idée de commercialiser le savon Sunlight, premier savon ménager vendu sous emballage à un prix accessible, permettant de généraliser la propreté et l'hygiène. En 1930, la fusion de la compagnie Hollandaise « Margarine Unie » et de la fabrique de savons « Lever Brother » entraîna la création d'Unilever : les deux sociétés utilisaient les mêmes matières premières, et commercialisaient leurs produits à grande échelle grâce aux mêmes filières de distributions.

En 1933, Lever commercialisa *Persil* (figure 3), première lessive véritablement formulée car constituée, comme son nom l'indique, de perborate et de silicate de sodium, mélangés à du savon en poudre.⁵ Cette lessive a une double action sur le linge : l'élimination des salissures grâce à l'action du savon et de l'alcali et la décoloration des tâches grâce à l'eau oxygénée libérée par la décomposition du perborate.



Figure 3 : Lessive « Persil » d'Unilever.

Aujourd'hui, les produits lessiviels sont devenus extrêmement sophistiqués puisqu'une formulation classique de lessive (tableau 1) comporte de vingt à trente ingrédients⁶ :

Ingrédient	Fonction	Exemple de composé
Tensioactifs	Permettent à l'eau de pénétrer dans les fibres pour aller extraire la salissure puis la solubiliser	LAS
Agents anti-redéposition	Evitent que les salissures présentes dans le liquide lessiviel ne se redéposent sur le linge	Carboxyméthylcellulose de sodium
Agents anticalcaires	Evitent l'effet néfaste du calcaire sur la détergence (incrustation des tâches)	Zéolithe
Agents de blanchiment	Décolorent les tâches.	TAED, perborate
Enzymes	<ul style="list-style-type: none"> - Les protéases dégradent les protéines que l'on trouve par exemple dans les tâches de sang. - Les amylases dégradent les tâches contenant de l'amidon - Les lipases, celles qui contiennent des lipides (sébum, corps gras...) - Les cellulases éliminent les fibrilles émergeant des fibres de coton usées 	

Tableau 1: Principaux ingrédients composant un produit lessiviel et leur fonction associée.^{5, 7}

La fonction principale de la lessive est, depuis toujours, le nettoyage du linge à savoir l'élimination des salissures et des odeurs corporelles adsorbées sur les fibres textiles. Les fonctions secondaires correspondent à des performances techniques telles que la souplesse au linge, ou la maîtrise des couleurs. Les fonctions tertiaires sont hédoniques car elles sont associées au plaisir que le consommateur peut éprouver au moment ou après l'utilisation du produit comme par exemple « l'odeur du propre » subsistant sur le linge lavé et séché.⁵

Au fur et à mesure, cette fonction hédonique a pris une place de plus en plus importante parmi les critères pris en compte par les utilisateurs pour acheter telle ou telle lessive. Il s'agit de conférer au linge une bonne odeur durable dans le temps en ajoutant des parfums compatibles avec les autres ingrédients à la formulation des lessives.

L'un des défis actuel à relever dans le domaine de la détergence consiste à obtenir une libération des parfums progressive et contrôlée dans le temps.^{8,9} Une alternative ou plutôt un complément à l'ajout de parfums dans la formulation consiste à générer de « bonnes » odeurs *in situ* lors du lavage, du séchage, du stockage ou de l'utilisation du linge, en déclenchant la libération des parfums par un processus chimique, physique, physico-chimique ou biochimique. Différentes techniques ont vu le jour ces dernières années telles que la micro encapsulation¹⁰ et les recours aux précurseurs de parfum. L'encapsulation de composés actifs dans une matrice ou dans des capsules spécifiques est la technique la plus répandue pour prolonger la durée de libération des parfums,¹¹ et augmenter leur stabilité dans les milieux agressifs.^{10,12}

Les « pro-parfums », représentent une alternative attrayante aux techniques classiques d'encapsulation.¹³ Ils libèrent une ou plusieurs molécules parfumantes par clivage chimique ou enzymatique de liaisons covalentes d'un précurseur non volatil et non odorant. Les déclencheurs typiques utilisables sont en nombre limité et incluent : la variation de température, l'exposition à la lumière du jour ou encore une variation de pH tel que dans le cas des précurseurs de géraniole présentés figure 4.¹²

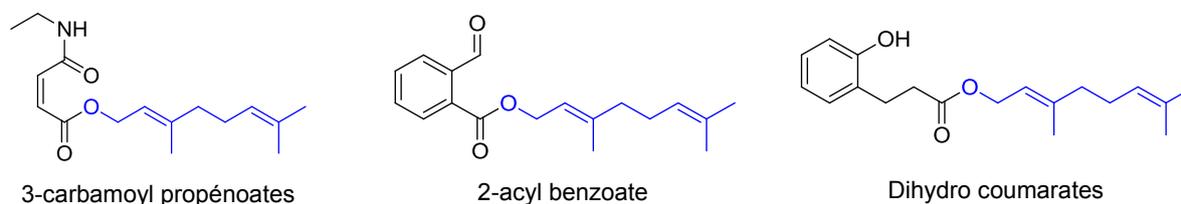


Figure 4 : Exemple de « pro-parfums » libérant du géraniole par cyclisation assistée du groupe voisin sous des conditions d'hydrolyse alcalines.^{12, 14}

Les enzymes et les microorganismes peuvent également être utilisés comme catalyseur. Ainsi, au début des années 1990, *Unilever* déposa un brevet concernant les parfums des lessives contenant des

lipases.⁷ En effet de mauvaises odeurs résiduelles (pieds sales ou vomi) avaient été perçues par les consommateurs et nuisaient donc à la performance globale du produit, notamment lorsque le linge était conservé quelques semaines dans un air un peu humide. L'odeur provenait de résidus d'acide gras, emprisonnés dans les fibres textiles, que les lipases résiduels du lavage continuaient à scinder en esters de triglycéride et en acide butyrique.¹⁵ C'est en 1995, que l'entreprise *Firmenich* breveta un composé, le succinate de digéranyle (DGS), capable de libérer le géranol, molécule parfumée sous l'action de lipase (schéma 1).¹⁶ Le DGS a été le premier précurseur de parfum commercialisé et introduit dans les formulations d'adoucissant.¹⁷ En 2002, Unilever breveta les « CLA alcohol ester » (Conjugated Linoleic Acid alcohol ester) issus de la réaction d'un alcool avec l'acide linoléique conjugué dont l'ester d'acide linoléique conjugué et de géranol.¹⁸

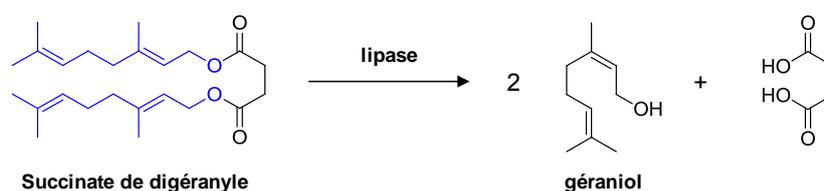


Schéma 1 : Libération du géranol à partir du succinate de digéranyle sous l'action de lipase.¹⁷

Néanmoins, ces techniques restent relativement coûteuses et ne permettent pas la libération d'un « accord » de parfum incluant plusieurs molécules parfumantes complémentaires.

En 1984, IFF déposa un brevet concernant des procédés permettant d'augmenter ou de renforcer les fragrances « d'air frais » sur les textiles.¹⁹ Cette invention repose sur une observation : le linge séché en extérieur ne véhicule pas la même odeur que lorsque celui-ci est séché à l'intérieur. Des recherches sur l'origine de ce phénomène ont alors montré que les acides gras insaturés, tels que les acides oléique, linoléique et linolénique, sous l'action de la lumière (UV) et au contact de l'air s'oxydent pour former des composés instables qui se dégradent en aldéhydes dont les longueurs de chaîne s'étagent entre C₇ et C₁₀. C'est ce mélange de composés organiques volatils qui est responsable de cette odeur de « frais ».²⁰

Par ailleurs, Unilever a montré récemment que la dégradation des produits d'oxydation du squalène est également précurseur de bonnes odeurs. En effet, il est apparu que l'oxydation photo-initiée du sébum réduit la production d'odeur rance. Par exemple, l'acide oléique s'oxyde en présence de photosensibilisateur pour produire du nonanal (odeur fruitée), du décane (odeur d'orange cireuse) et du 2-décane (odeur de zeste d'orange) tandis que le squalène s'oxyde pour produire des odeurs sucrées ressemblant au caramel et au miel.

Le point commun de ces deux types de précurseurs de fragrances potentiels est leur présence, à des taux non négligeables, dans la composition du sébum (cf. ci-après), naturellement présent à la surface

de la peau humaine. Or, il est reconnu qu'un linge n'est jamais propre à 100 % et qu'il subsiste toujours des salissures diverses dont le sébum.²¹ En effet 2 à 8 % en masse s'en trouve transféré sur le linge sachant qu'à la fin d'un cycle de lavage, il reste entre 4 et 30 mg de salissure par gramme de tissus.

COMPOSITION DU SEBUM²²

- ≈ 60% d'acides gras (insaturés, saturés ou libres)
- ≈ 26% d'esters d'acides gras
- ≈ 12% de squalène
- ≈ 2% de cholestérol

Les acides gras représentent plus de la moitié de sa composition d'où un fort potentiel de précurseur de « bonnes » odeurs *in situ*. Par ailleurs, le squalène, triterpène de formule chimique $C_{30}H_{50}$, porteur de 6 doubles liaisons oxydables, est présent à hauteur de 12% à la surface de la peau et se retrouve donc dans les résidus de salissures présents sur le linge.

Que ce soit pour les acides gras ou le squalène, les mécanismes de formation de « bonnes » odeurs reposent sur leur réactivité avec l'oxygène sous sa forme excitée, l'oxygène singulet. L'oxygène est l'agent oxydant le plus important sur Terre de par son omniprésence. En effet, à température ambiante, il réagit lentement avec de nombreux composés organiques. La maîtrise de ce processus est primordiale pour l'obtention industrielle de certains produits chimiques tel que l'acétone, mais aussi pour prévenir la dégradation des composés insaturés.

Les mécanismes d'interaction des composés insaturés avec l'oxygène fondamental, 3O_2 , appelé autoxydation, ont beaucoup été étudiés à cause notamment de leurs effets néfastes dans les domaines de l'alimentaire, de la détergence et de la parfumerie, voir même dans l'origine de certaines maladies. En effet, l'oxydation des acides gras peut entraîner une dégradation des propriétés olfactives et gustatives des huiles, en leur conférant un mauvais goût et une odeur rance.²³ Par ailleurs, en détergence l'oxydation des salissures grasses insaturées est associée à des phénomènes secondaires indésirables : (1) l'émission d'odeurs désagréables sur les vêtements, (2) la formation de macromolécules difficiles à éliminer, (3) la formation de composés colorés insolubles, par condensation de salissures protéiniques.

D'autre part, les terpènes, de formule générale $(C_5H_8)_n$, sont des hydrocarbures naturels, dérivés de l'isoprène, dont la plupart constituent des molécules odoriférantes dans le domaine de la parfumerie. Les terpénoïdes correspondent à des terpènes modifiés par l'introduction d'atomes d'oxygène au sein de la chaîne carbonée.²⁴ Du fait de leur omniprésence chez les végétaux, et de leurs propriétés olfactives, ces molécules, et plus particulièrement les mono-terpènes, sont largement utilisées dans le

domaine de la parfumerie. Cependant, ces derniers peuvent former des produits, hautement allergènes, après oxydation.



Les problèmes d'allergie cutanée sont les plus communs dans les pays industrialisés et il est estimé que 20% de la population dans l'Europe de l'ouest est allergique à un ou plus produits chimiques de son environnement²⁵. Les fragrances sont, après le nickel, la cause la plus importante d'allergie cutanée. Dans le cas des terpènes, leur autoxydation « augmente » sensiblement leur caractère allergisant. Les hydroperoxydes formés sont des irritants cutanés difficilement détectables à faible concentration.²⁶ Ces allergènes de contact sont capables de pénétrer dans la peau et de réagir avec les protéines pour former des antigènes²⁷ par un mécanisme radicalaire.²⁸

De manière générale, l'autooxydation des composés insaturés se produit selon un mécanisme radicalaire en chaîne, constitué de trois étapes principales : l'initiation, la propagation et la terminaison. L'étape d'initiation résulte de l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur le substrat, sous l'effet de la lumière, de la chaleur, en présence de métaux en formant un radical alkyle, noté R[•] (équation 1). Ce dernier réagit alors avec l'oxygène fondamental, ³O₂, en donnant des radicaux peroxydes ROO[•] (équation 2), à l'origine de l'étape de propagation de la réaction radicalaire en chaîne. A partir de là, plusieurs réactions sont possibles : **1**) le radical peroxyde peut arracher un atome d'hydrogène à une molécule voisine, formant ainsi des hydroperoxydes et un nouveau radical alkyle (équation 3), continuant la propagation de la réaction radicalaire ; **2**) il peut également se recombiner avec un autre radical présent dans le milieu, produisant alors un produit non radicalaire : c'est l'étape de terminaison (équations 4 à 6).

Initiation



Propagation



Terminaison



Une autre voie d'oxydation des composés organiques est l'oxygène singulet ¹O₂. Il semblerait que la plus ancienne description d'une réaction impliquant cet état particulier d'O₂ remonte à 1867 par

Fritzsche (figure 5). Il reporta que le naphtacène réagit en présence de lumière et d'oxygène, pour donner un composé capable de régénérer le naphtacène lorsqu'il est chauffé. A cette date, ni la nature de l'espèce oxydante, ni la structure du composé oxydé n'étaient connus.²⁹

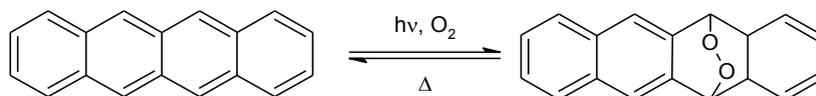


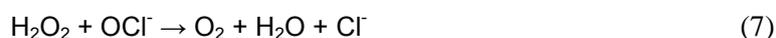
Figure 5 : Réaction de Fritzsche pour la formation de l'endoperoxyde du Naphtacène

En fait, cet état de l'oxygène a été réellement découvert et identifié en 1924 par des astrophysiciens puisqu'il se forme dans la haute atmosphère au cours des aurores boréales (figure 6). En 1934 Herzberg découvrit dans le spectre solaire infra-rouge une raie à 12 900 angströms qu'il attribua à un état excité singulet de l'oxygène.³⁰



Figure 6 : Luminescence rouge due à l'oxygène singulet lors d'une aurore boréale.³⁰

En 1927, Mallet, un chimiste français trouva que l'anion OCI^- en présence de peroxyde d'hydrogène entraîne la formation d' O_2 accompagné d'une faible luminescence rouge foncé (équation 7). Il fallu attendre 1963 et 1964, Khan et Kasha pour identifier cette luminescence comme la formation du premier état excité de l'oxygène, l'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$).^{31,32}



Entre 1968 et 1970, Foote attira l'attention sur l'importance de $^1\text{O}_2$ en biologie.³³ En 1970, une conférence internationale lui fut dédiée afin de faire le point sur son rôle dans le cancer, le vieillissement et sa toxicité. Durant cette session, il fut montré que $^1\text{O}_2$ est 1000 fois plus réactif en présence d'acides gras insaturés pour former des peroxydes que $^3\text{O}_2$ (schéma 2). Depuis, l'étude de la production et de la réactivité de l'oxygène singulet a émergé comme une spécialité riche et diversifiée avec des implications dans des domaines allant de la science des polymères à la thérapie du cancer. Par ailleurs, $^1\text{O}_2$ a suscité un vif intérêt en synthèse organique de part sa régiosélectivité et sa

chemiosélectivité, en particulier au regard de sa capacité à former des hydroperoxydes selon un mécanisme de « ène » réaction.^{34, 35}

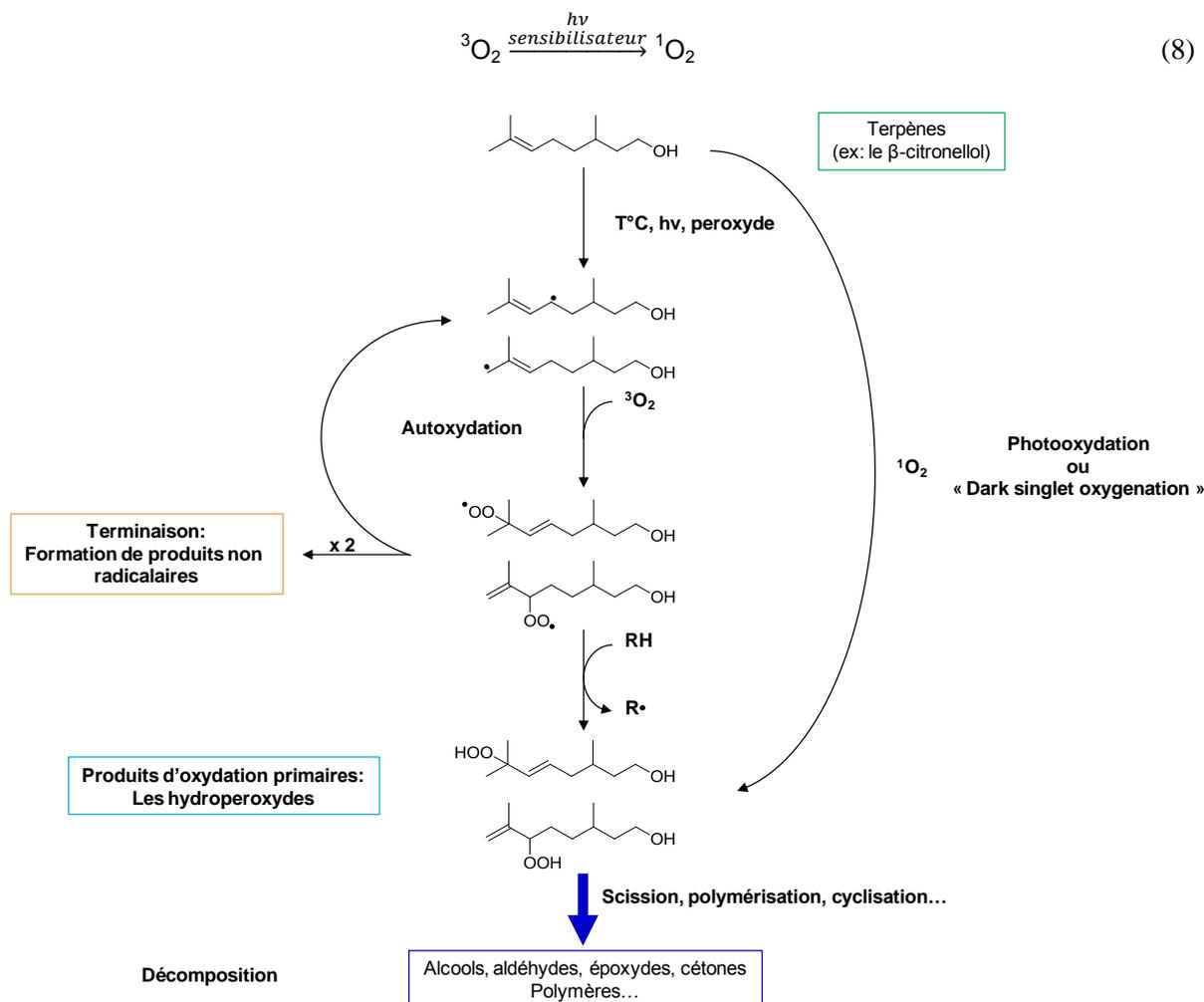
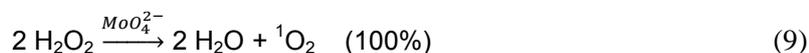


Schéma 2 : Exemple d'oxydation d'une oléfine trisubstituée par l'oxygène triplet $^3\text{O}_2$ et l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$.

La production d'oxygène singulet par photochimie trouve un intérêt dans un éventail de domaines : la photooxydation, l'oxydation sélective de l'ADN, la thérapie photodynamique du cancer ou encore la science des polymères. Il existe différents groupes de photosensibilisateurs : **1)** certains colorants organiques et composés aromatiques, **2)** les porphyrines et les phtalocyanines, **3)** les semi-conducteurs et **4)** certains complexes de métaux de transition. La génération photochimique est une méthode simple pour la production de $^1\text{O}_2$ qui ne nécessite que de l'oxygène, de la lumière à une longueur d'onde appropriée et un photosensibilisateur capable d'absorber cette lumière et de subir un transfert intersystème efficace pour transmettre son énergie à l'oxygène afin de l'exciter (équation 8).³⁶

De nombreuses autres voies non-photochimiques de formation de l'oxygène singulet ont été découvertes. Les plus efficaces fonctionnent par oxydation ou par dismutation du peroxyde d'hydrogène. La plus connue reste sans doute la réaction de Mallet (équation 7). Néanmoins, cette

source chimique de formation d'oxygène singulet donne souvent lieu à des réactions secondaires en raison du pouvoir oxydant élevé de l'hypochlorite.³⁷ Un générateur chimique doux d' $^1\text{O}_2$ a été développé au laboratoire, il implique la dismutation du peroxyde d'hydrogène catalysée par des ions molybdate.³⁸⁻⁴⁰ Cette réaction très efficace se déroule à température ambiante et tout l'oxygène engendré est à l'état excité singulet (équation 9).



L'oxygène singulet trouve également sa place dans le traitement des eaux usées, la synthèse en chimie fine ainsi que des applications photodynamiques telles que la stérilisation du sang, l'activation sous la lumière du soleil d'herbicides et d'insecticides.³⁶ En outre, la formation de $^1\text{O}_2$ à partir de H_2O_2 , réactif bon marché et non polluant, a permis l'ouverture d'autres perspectives quant à son application en milieu industriel grâce à la substitution possible des sources photochimiques coûteuses et délicates à maîtriser à grande échelle. Par exemple, la formation des peroxydes par $^1\text{O}_2$ a été mise à profit, dans le cas du β -citronellol pour la production industrielle de l'oxyde de rose (schéma 3).⁴¹

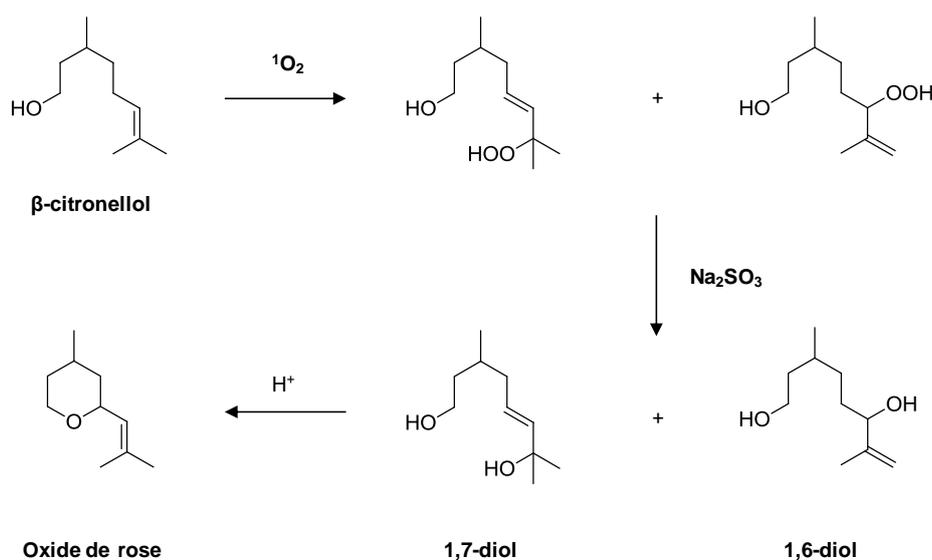


Schéma 3 : Synthèse industrielle de l'oxyde de rose via l'oxygénation singulet du β -citronellol.⁴¹

La dégradation des composés primaires d'oxydation permet la génération de COVs (Composés Organiques Volatils) odoriférants à l'origine des odeurs vertes et fraîches émises par les végétaux. En effet, les hydroperoxydes sont des composés instables, à l'origine de radicaux alcoyles RO^\bullet ou peroxydes ROO^\bullet capables de se réarranger ou de se dégrader. De nouveaux produits d'oxydation vont alors être formés tels que les alcools, les aldéhydes, les cétones. D'autres mécanismes peuvent être impliqués, telle que la cyclisation pour former des époxydes par exemple. La présence de radicaux peut également être à l'origine d'une polymérisation donnant lieu à la formation de macromolécules.

A partir de ces considérations nous avons entrepris d'étudier l'oxydation par $^1\text{O}_2$ du squalène (figure 7) en hydroperoxydes, dans le but d'utiliser ce composé naturel comme source de molécules volatiles odorantes, issues de la décomposition des hydroperoxydes intermédiaires.

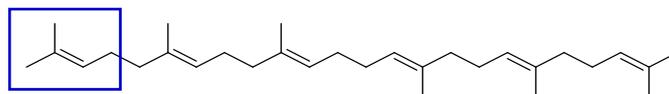


Figure 7 : Structure moléculaire du squalène.

Le squalène présente une réactivité vis-à-vis de $^1\text{O}_2$ au moins 100 fois supérieure à celle des autres lipides épidermiques.⁴² C'est pourquoi la présence de squalène à la surface de la peau promeut la peroxydation de l'ensemble des lipides épidermiques, ce qui suggère qu'il joue un rôle clé dans les dommages cutanés photo-induits tel que l'hyperpigmentation par exemple.⁴³ La plupart des études traitent de l'implication de l'oxygène singulet dans l'oxydation du squalène présent à la surface de la peau, favorisée par la présence de divers photosensibilisateurs tels que les dérivés thiophéniques^{44, 45} ou porphyrine par exemple.^{43, 46, 47, 48} Sous irradiation aux UVA, le squalène produit majoritairement un mélange de mono-hydroperoxydes $|\text{SQ}(\text{OOH})_1|$.⁴⁹ La présence de six doubles liaisons facilite l'oxydation du substrat, conduisant à un grand nombre d'hydroperoxydes isomères possibles. K. Nakagawa et al.⁵⁰ ont réalisé la séparation des mono-hydroperoxydes par CLHP. Ainsi, huit isomères $\text{SQ}(\text{OOH})_1$ ont été décelés (figure 8) à la surface de la peau, suite à une exposition au soleil.

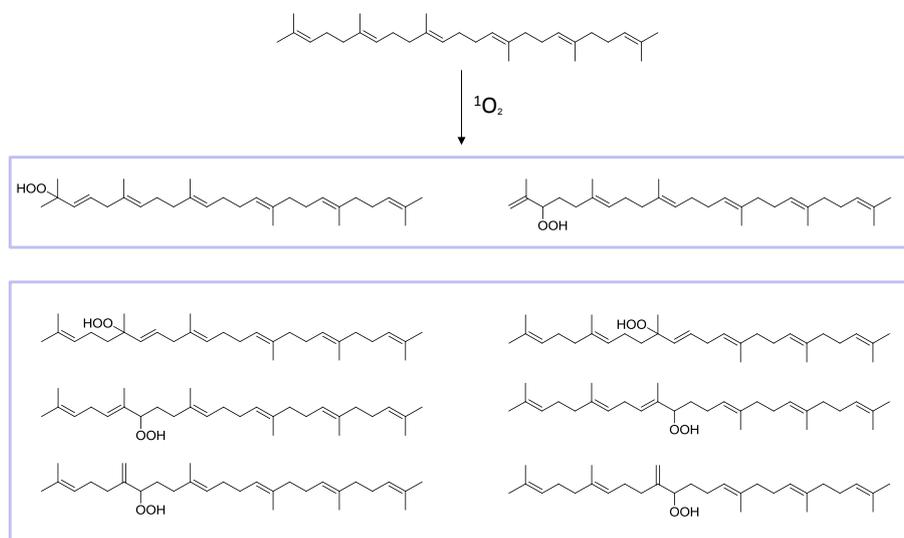


Figure 8 : Structures chimiques des 8 mono-hydroperoxydes possibles $\text{SQ}(\text{OOH})_1$ par réaction de l'oxygène singulet sur le squalène.

Par ailleurs, lorsque le squalène est exposé à un fort stress oxydant, ou en présence de photosensibilisateur, des produits plus oxydés sont obtenus. Ainsi, Nakano et al.⁵¹ ont reporté également la formation de di- $\text{SQ}(\text{OOH})_2$ et de tri- $\text{SQ}(\text{OOH})_3$ hydroperoxydes. Mountfort et al.⁵² ont détecté la formation de penta-hydroperoxydes, $|\text{SQ}(\text{OOH})_n, n = 1-5|$ après 20 jours d'exposition aux UVs.

La présence de six doubles liaisons oxydables le long de la molécule de squalène complexifie l'étude de son oxydation et l'élucidation des mécanismes de dégradation de ses peroxydes, c'est pourquoi nous nous sommes également intéressés à un certain nombre de molécules « modèles » plus simples (tableau 2). Ces composés sont des terpènes et des terpénoïdes présentant au moins un motif de sous-structure identique à celui du squalène (encadrée en bleu sur la figure 7). L'oxydation via $^1\text{O}_2$ de ce type de substrats a déjà été étudiée et plus particulièrement dans le cas du citronellol et du géraniol qui sont des fragrances importantes.^{12, 53} De plus, Tanielian et al. ont déjà utilisé ces alcools comme modèles pour l'étude de l'oxydation du polyisoprène par l'oxygène singulet.⁵⁴⁻⁵⁶

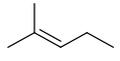
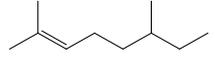
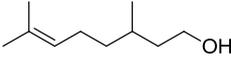
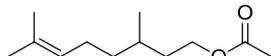
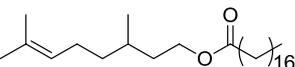
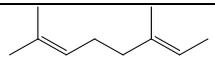
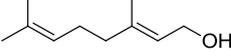
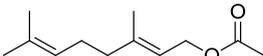
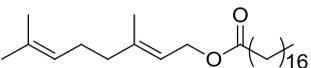
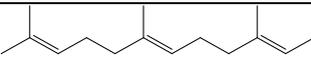
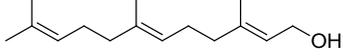
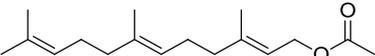
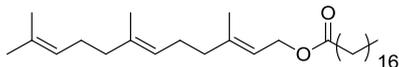
Substrat	Structure chimique
Amylène	
2-méthyl-2-pentène	
2,6-diméthyl-2-octène	
Citronellol	
Acétate de citronellyle	
Stéarate de citronellyle	
2,6-diméthyl-2,6-octadiène	
Géraniol	
Acétate de géranyle	
Stéarate de géranyle	
2,6,10-triméthyl-2,6,10-dodecatriène	
Farnésol	
Acétate de farnésyle	
Stéarate de farnésyle	

Tableau 2 : Ensemble des sous-structures étudiées dans le cadre de ces travaux de thèse. Seuls les résultats obtenus pour les composés en bleu seront reportés dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

L'un des avantages que présentent les terpénoïdes vis-à-vis des terpènes pour l'étude de la formation des hydroperoxydes est la présence de groupements polaires caractéristiques qui vont permettre une meilleure identification et différenciation des hydroperoxydes formés en position β et γ par rapport la

fonction alcool. Par ailleurs, l'amylène et le 2-méthyl-2-pentène se sont trouvés être des composés hautement volatils rendant difficile leur étude.

L'un des objectifs de la thèse est d'examiner la possibilité d'utiliser le squalène comme précurseur *in situ* de fragrances en utilisant des procédés et des matières premières déjà exploités dans le domaine de la détergence. Les peroxydes semblent être les intermédiaires à favoriser pour la libération de COVs à partir des résidus de salissures corporelles persistants sur le linge. Il a été démontré à maintes reprises que sous l'action de la lumière et en présence d'oxygène, les composés insaturés du sébum s'oxydent pour former des hydroperoxydes. Nous nous sommes donc attachés à former principalement ces intermédiaires oxydés en faisant réagir de l'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$, sur le squalène ainsi que sur les sous-structures sélectionnées. Différents moyens d'investigation ont été mis en œuvre (RMN, CLHP, SM) afin de définir et de quantifier les produits d'oxydation alors obtenus. Malgré la multiplication des techniques analytiques, il n'a pas été possible de définir exactement la structure du squalène peroxydé 6 fois. Cependant nous avons pu démontrer que les solutions peroxydées résultaient en des mélanges complexes contenant au moins trois degrés de peroxydation différents dès les premières minutes d'oxydation.

Les résultats de cette première partie d'expériences ont servi de base à l'élucidation des mécanismes de décomposition des hydroperoxydes, en nous permettant de connaître la structure des composés thermolysés. Pour ce faire les échantillons ont été dégradés à 80°C et des analyses en spectrométrie de masse en temps réel couplées à de le RMN ont permis d'identifier les COVs obtenus.

Afin de concrétiser la dégradation des peroxydes dans le domaine de la détergence, nous avons approfondi l'étude de la dégradation des hydroperoxydes catalysée par voie enzymatique ou en présence de complexe métallique. Dans un premier temps, deux complexes catalytiques ferreux à base de ligand pentadenté ont été évalués comme initiateur de la dégradation des hydroperoxydes de squalène à température ambiante en raison de leur efficacité à interagir en présence de peroxyde d'hydrogène. Cette dernière alternative semble être la solution pour libérer des molécules odorantes à partir de matières premières renouvelables et à bas prix, tout en prenant en considération des contraintes hypoallergéniques, économiques, énergétiques et environnementales. Puis, des hydroperoxyde-lyases ont été testées en présence d'hydroperoxydes de squalène.

Pour démontrer ces différents points, nous avons entrepris l'étude du squalène qui apparaît être un composé non négligeable dans la composition du sébum. Avec ses liaisons oxydables, il semble être un potentiel précurseur de COVs de même qu'il l'a été démontré précédemment pour les lipides. Nous avons dans un premier temps réalisé une étude bibliographique dense concernant l'oxydation des acides gras insaturés, ainsi que des mécanismes de dégradation des peroxydes lipidiques (**Chapitre I**).

Dans un second temps nous avons étudié l'oxydation du squalène par l'oxygène singulet par voie photochimique et chimique grâce à un système molybdate de sodium/péroxyde d'hydrogène, puis nous avons tenté d'élucider les mécanismes de dégradation thermique des hydroperoxydes de squalène (**Chapitre II**). Dans un troisième temps, l'étude de l'oxydation de terpènes et de terpénoïdes, dits « modèles », présentant le même motif de base que SQ, a été effectuée. Cette partie a pour objectif de simplifier la compréhension des mécanismes relatifs au squalène grâce à des composés mono-, di- et tri- insaturés qui vont à leur tour être oxydés par $^1\text{O}_2$ et dégradés par thermolyse (**Chapitre III**). Enfin, la dernière partie concerne l'utilisation d'autres voies de dégradation des hydroperoxydes : la voie catalytique et celle enzymatique. La dégradation des SQ(OOH) sera alors considérée en présence de complexes ferreux à base d'un ligand pentadenté, développés par Unilever, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-MeN}_4\text{Py}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-bispidone}$. La décomposition des peroxydes de squalène en présence d'hydroperoxyde-lyase sera également succinctement évaluée (**Chapitre IV**).

Références bibliographiques de l'introduction générale

1. Procter & Gamble, *L'histoire du lavage*. Available from: <http://www.scienceinthebox.com/>.
2. C. Clément, P. Clément. *Vivre dans les Alpes-Maritimes à l'époque romaine*. Available from: <http://romains-alpes-maritimes.com/pages/artisans-foulon-teinturerie.html>.
3. D. Roche, *A history of everyday things: the birth of consumption in France, 1600-1800*, ed. C. u. press. **2000**.
4. *William Lever, 1st Viscount Leverhulme*. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/William_Lever,_1st_Viscount_Leverhulme.
5. V. Nardello-Rataj, L. Ho Tan Tai and J.M. Aubry, Les lessives en poudre *L'actualité chimique*, **2003**: 3-5.
6. L. Ho Tan Tai, *Formulating detergent and personal care products, a complete guide to product development*. **2000**: AOCs Press.
7. J.M. Behan, D. Perring and B.J. Willis, *Perfumes for use in laundry detergents containing lipase*, **1991**, Unilever PLC, UK . CA2026512A1
8. S. Escher, E. Oliveros, A quantitative study of factors that influence the substantivity of fragrance chemicals on laundered and dried fabrics. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1994**. *71(1)*: 31-40.
9. T. Stora, S. Escher and A. Morris, The physicochemical basis of perfume performance in consumer products. *Chimia*, **2001**. *55*: 406-412.
10. S.-J. Park, R. Arshady, Microcapsules for fragrances and cosmetics. *Microspheres, Microcapsules Liposomes*, **2003**. *6*: 157-198.
11. L. Brannon-Peppas, Controlled Release in the Food and Cosmetics Industries, in *ACS Sym. Ser.* **1993**, American Chemical Society. p. 42-52.
12. A. Herrmann, Controlled Release of Volatiles under Mild Reaction Conditions: From Nature to Everyday Products. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**. *46(31)*: 5836-5863.
13. M. Gautschi, J.A. Bajgrowicz and P. Kraft, Fragrance chemistry - milestones and perspectives. *Chimia*, **2001**. *55*: 379-387.
14. J.-Y. De Saint Laumer, E. Frérot and A. Herrmann, Controlled Release of Perfumery Alcohols by Neighboring-Group Participation. Comparison of the Rate Constants for the Alkaline Hydrolysis of 2-Acyl-, 2-(Hydroxymethyl)-, and 2-Carbamoylbenzoates. *Helv. Chim. Acta*, **2003**. *86(8)*: 2871-2899.
15. W. Aehle, *Enzymes in Industry*. **2007**: Wiley-VCH. 490.

-
16. W. Paget, D. Reichlin, R.L. Snowden, E.C. Walborsky and C. Vial, *Laundry detergent and softener compositions for imparting perfume odor to fabrics*, **1995**, Firmenich S. A., Switz. . WO9504809A1
 17. V. Nardello-Rataj, L. Ho Tan Tai, *Formulation des détergents - Produits d'entretien des articles textiles* *Techniques de l'ingénieur*, **2006**.
 18. S. Barclay, K.P. Rakowski and V. Taran, *CLA-esters*, **2002**, Unilever N.V., Neth.; Unilever PLC; Lodens Crokiaan BV . EP1167340A2
 19. I.D. Hill, R.W. Trenkle, Braja D. Mookherjee, Robin K. Wolff, *Process for augmenting or enhancing the fresh air aroma of consumable materials and clothing and composition useful for same*, **1984**, International Flavors and Fragrances,
 20. B.D. Mookherjee, R.W. Trenkle. *Sun-scents: the production of aroma molecules by the action of sunlight on the essential oil of cotton*. **1989**: Oxford & IBH.
 21. D.T. Downing, J.S. Strauss, *Synthesis and composition of surface lipids of human skin* *J Invest Dermatol*, **1974**. 62(3).
 22. Unilever, *Improvements relating to fabric freshness, in progress*,
 23. F. Shahidi, Y. Zhong, *Lipid oxidation and improving the oxidative stability*. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**. 39(11): 4067-4079.
 24. P.M. Dewick, *The Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids*, in *Medicinal Natural Products*. **2009**, John Wiley & Sons, Ltd. p. 187-310.
 25. C. Bäcktorp, L. Hagvall, A. Börje, A.-T. Karlberg, P.-O. Norrby and G. Nyman, *Mechanism of Air Oxidation of the Fragrance Terpene Geraniol*. *J. Chem. Theory Comput.*, **2007**. 4(1): 101-106.
 26. L. Hagvall, C. Bäcktorp, P.-O. Norrby, A.-T. Karlberg and A. Börje, *Experimental and Theoretical Investigations of the Autoxidation of Geraniol: A Dioxolane Hydroperoxide Identified as a Skin Sensitizer*. *Chem. Res. Toxicol.*, **2011**. 24(9): 1507-1515.
 27. L. Hagvall, C. Bäcktorp, S. Svensson, G. Nyman, A. Börje and A.-T. Karlberg, *Fragrance Compound Geraniol Forms Contact Allergens on Air Exposure. Identification and Quantification of Oxidation Products and Effect on Skin Sensitization*. *Chem. Res. Toxicol.*, **2007**. 20(5): 807-814.
 28. M. Bezd, A.-T. Karlberg, J. Montelius and J.-P. Lepoittevin, *Skin Sensitization to Linalyl Hydroperoxide: Support for Radical Intermediates*. *Chem. Res. Toxicol.*, **1997**. 10(9): 987-993.
 29. E.L. Clennan, *New Mechanistic and Synthetic Aspects of Singlet Oxygen Chemistry*. *Tetrahedron*, **2000**. 56(47): 9151-9179.
-

30. C. Deby, *L'oxygène singulet et la vie : partie A - généralités*. Available from: <http://www2.ulg.ac.be/cord/oxygene%20singulet%20oxsgpara.html>.
31. A. Khan, M. Kasha, Red chemiluminescence of oxygen in aqueous solution. *J. Chem. Phys.*, **1963**. 39: 2105-6.
32. A.U. Kahn, M. Kasha, Rotational structure in the chemiluminescence spectrum of molecular oxygen in aqueous systems. *Nature (London, U. K.)*, **1964**. 204: 241-3.
33. C.S. Foote, Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science*, **1968**. 162: 963-70.
34. M. Prein, W. Adam, The Schenck Ene Reaction: Diastereoselective Oxyfunctionalization with Singlet Oxygen in Synthetic Applications. *Angew. Chem. Intern. Edit.* , **1996**. 35(5): 477-494.
35. G.O. Schenck, H. Eggert and W. Denk, Photochemische Reaktionen III. Über die Bildung von Hydroperoxyden bei photosensibilisierten Reaktionen von O₂ mit geeigneten Akzeptoren, insbesondere mit α - und β -Pinen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1953**. 584(1): 177-198.
36. M.C. DeRosa, R.J. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**. 233–234(0): 351-371.
37. V. Nardello, M.-J. Marti, C. Pierlot and J.M. Aubry, Photochemistry without Light: Oxidation of Rubrene in a Microemulsion with a Chemical Source of Singlet Molecular Oxygen (1O₂, 1Dg). *J. Chem. Educ.*, **1999**. 76(9): 1285.
38. J.M. Aubry, Search for singlet oxygen in the decomposition of hydrogen peroxide by mineral compounds in aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**. 107: 5844-9.
39. J.M. Aubry, S. Bouttemy, Preparative Oxidation of Organic Compounds in Microemulsions with Singlet Oxygen Generated Chemically by the Sodium Molybdate/Hydrogen Peroxide System1. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**. 119(23): 5286-5294.
40. V. Nardello, M.J., Vermeersch G., Aubry J. M., 90Mo NMR and kinetic studies of peroxomolybdic intermediates involved in the catalytic disproportionation of hydrogen peroxide by molybdate ions. *Inorg. Chem.*, **1995**. 34: 4950-7.
41. P.L. Alsters, W. Jary, V. Nardello-Rataj and J.-M. Aubry, “Dark” Singlet Oxygenation of β -Citronellol: A Key Step in the Manufacture of Rose Oxide. *Org. Process Res. Dev.*, **2009**. 14(1): 259-262.
42. Y. Kohno, Y. Egawa, S. Itoh, S.-i. Nagaoka, M. Takahashi and M. K., Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *BBA - Lipid Lipid Met.*, **1995**. 1256(1): 52-56.
43. A. Ryu, K. Arakane, C. Koide, H. Arai and T. Nagano, Squalene as a Target Molecule in Skin Hyperpigmentation Caused by Singlet Oxygen. *Biol. Pharm. Bull.*, **2009**. 32(9): 1504-1509.

-
44. M. Sasaki, K. Tokiwa, H. Mori, T. Sakata and H. Fujita, Peroxidation of model lipids in the presence of thiophene derivatives with UV-A light. *Photomed. Photobiol.*, **1990**. 12: 177-8.
 45. H. Fujita, K. Tokiwa, K. Sayama, H. Mori and M. Sasaki, Mechanistic Study of the Photooxidation of Squalene Sensitized with 2,2'-; : 5'-;2'-;Terthiophene and 2,2'-;Bithiophene. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1993**. 66(10): 2960-2964.
 46. S.M. Ribeiro, A.C. Serra and A.M.d.A. Rocha Gonsalves, Immobilised porphyrins in monoterpene photooxidations. *J. Catal.*, **2008**. 256(2): 331-337.
 47. K. Arakane, A. Ryu, C. Hayashi, T. Masunaga, K. Shinmoto, S. Mashiko, T. Nagano and M. Hirobe, Singlet Oxygen ($^1\Delta_g$) Generation from Coproporphyrin in *Propionibacterium acnes* Irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**. 223(3): 578-582.
 48. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.*, **1993**. 331(3): 304-306.
 49. S.E. Mudiyansele, M. Hamburger, P. Elsner and J.J. Thiele, Ultraviolet A induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, **2003**. 120: 915-922.
 50. K. Nakagawa, D. Ibusuki, Y. Suzuki, S. Yamashita, O. Higuchi, S. Oikawa and T. Miyazawa, Ion-trap tandem mass spectrometric analysis of squalene monohydroperoxide isomers in sunlight-exposed human skin. *J. Lipid Res.*, **2007**. 48: 2779-2787.
 51. M. Nakano, Y. Kambayashi, H. Tatsuzawa, T. Komiyama and K. Fujimori, Useful 1O_2 ($^1\Delta_g$) generator, 3-(4'-methyl-1'-naphthyl)-propionic acid, 1',4'-endoperoxide (NEPO), for dioxygenation of squalene (a skin surface lipid) in an organic solvent and bacterial killing in aqueous medium. *FEBS Lett.*, **1998**. 432: 9-12.
 52. K.A. Mountfort, H. Bronstein, N. Archer and S.M. Jickells, Identification of Oxidation Products of Squalene in Solution and in Latent Fingerprints by ESI-MS and LC/APCI-MS. *Anal. Chem.*, **2007**. 79(7): 2650-2657.
 53. D.G. Kurt Bauer, Horst Surburg, Common fragrance and flavor materials: preparation properties and uses. **1997**: Wiley.
 54. C. Tanielian, R. Mechin, Reactions of singlet oxygen with polyisoprene and model compounds. *Tetrahedron*, **1985**. 41(11): 2139-2146.
 55. C. Tanielian, J. Chaineaux, Singlet oxygen reactions with model compounds of cis and trans polyisoprene containing two units. *J. Photochem.*, **1978**. 9(1): 19-32.
 56. C. Tanielian, J. Chaineaux, Sensitized photo-oxidation of polyisoprene: effect of the presence of hydroxy and hydroperoxy groups. *Eur. Polym. J.*, **1980**. 16(7): 619-622.
-

Chapitre I _____

Peroxydation et Dégradation Oxydante des Acides

Gras Insaturés : Etat de l'Art

Introduction

L'oxygène est l'un des éléments les plus importants sur Terre car il représente 21% de l'atmosphère, 89% de l'eau de mer en masse et au moins 47% de la croûte terrestre. En dépit de son apparente simplicité, la molécule d'oxygène, $^3\text{O}_2$, révèle un nombre de propriétés inhabituelles (complexes) au regard de ses comportements magnétique et spectroscopique, des processus de transfert d'énergie et de sa réactivité chimique.¹ Mulliken démontra, en 1928, que ses propriétés paramagnétiques sont dues aux spins parallèles des deux électrons de l'orbitale HOMO. Quant à l'oxygène excité à l'état singulet, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), Foote et Wexler ont montré, en 1964, que cette espèce est impliquée dans les processus de photooxydation.² Bien qu'indispensable dans de nombreux systèmes biologiques, l'oxygène singulet est également responsable de nombreux processus de dégradation de composés, suffisamment riches en électrons, tels que les hydrocarbures à chaînes insaturées (ex : lipides ou acides gras insaturés, les terpènes, polymères...).

Le problème de la dégradation oxydante des lipides est d'une grande importance économique et toxicologique notamment dans le domaine alimentaire. En effet, leur oxydation *in vitro* altère la qualité des produits (mauvaises odeurs, rancissement) et la qualité nutritionnelle (perte en vitamines) mais diminue également la sécurité alimentaire par la formation de produits secondaires parfois toxiques (aldéhydes) due aux produits issus de la peroxydation lipidique.³ Le problème de la peroxydation des lipides est également un phénomène *in vivo* très important. En effet, les membranes des cellules sont composées de 30 à 50% d'acides gras polyinsaturés. La lipoperoxydation des membranes endommage leur fonctionnalité en modifiant leur perméabilité, leur fluidité ou encore en entraînant la perte d'activité enzymatique par modification du récepteur. La compréhension de ces phénomènes a été permise grâce à des efforts concertés des universités, des industries et des gouvernements.⁴ Il en résulte une littérature particulièrement riche concernant les mécanismes et les produits d'oxydation et de dégradation des composés insaturés.

L'objectif de cette thèse est l'élucidation des mécanismes de dégradation oxydante des résidus de sébum susceptibles de se trouver sur les vêtements. En effet ces composés insaturés se trouvent être sensibles à l'oxygène de l'air et il a été observé que leur dégradation, au contact de ce dernier, libère des composés volatils présentant une note « verte ».⁵ Cette information peut présenter un intérêt en détergence où la recherche d'une odeur de linge « frais », durable dans le temps, est le cœur de nombreux sujets d'études.

Les lipides présents à la surface de la peau humaine sont un mélange constitué d'approximativement 50% de sébum et 50% de transpiration. En 1949, Mackenna et al. ont été les premiers à étudier la composition du sébum⁶ récupéré grâce à de l'acétone sur l'avant-bras de 107 personnes. Les analyses

ont été réalisées par chromatographie sur couche mince ou gazeuse. Le tableau 1 décrit la composition du sébum d'après le croisement de trois documents datant respectivement de 1949, 1974 et 2009.

Composants		Sébum (% massique)		
		1949 ^b	1974 ^c	2009 ^d
Acides gras	Libres, insaturés	20		5-40
	Libres, saturés	10	57,5	
	Triglycérides	25		20-60
Esters	Glycérides	2		
	Esters d'acides gras	26	26	23-29
	Esters de cholestérol		3,0	
	Hydrocarbures	10		
	Squalène	5	12,0	10-14
	Cholestérol	5	1,5	1-5

Tableau 1 : Composition approximative du sébum.⁶⁻⁸

Les acides gras tels que l'acide myristique (C₁₄), l'acide palmitique (C₁₆), l'acide stéarique (C₁₈), l'acide oléique (C_{18:1 ω-9}) ou l'acide linoléique (C_{18:2 ω-6}) comptent pour 37% en masse. Les 63% restants sont composés d'un mélange de plus de 200 acides gras avec des chaînes en C₁₀-C₁₈, et d'un triterpène, le squalène.^{9, 10}

Le terme « corps gras » désigne principalement les lipides (triglycérides, esters de glycérol et acides gras). Les acides gras possèdent des structures différentes selon leur origine. Ceux dérivés de sources animales ou végétales contiennent en général un nombre pair d'atomes de carbone alors que dans les triglycérides naturels (figure 1), des chaînes d'acide gras ramifiées ou contenant un nombre impair de carbones sont observées en faible concentration. Les acides gras dérivés de ces triglycérides peuvent être saturés, mono-insaturés ou polyinsaturés et les doubles liaisons sont principalement dans une configuration *cis* (Z) (Exemple l'acide linoléique, figure 2).

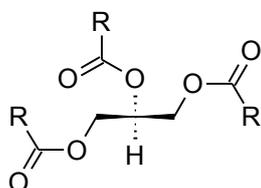


Figure 1 : Structure moléculaire d'un triglycéride

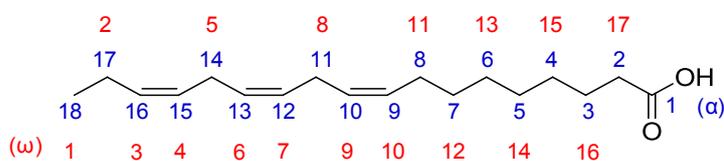


Figure 2 : L'acide linoléique : exemple d'acide gras ω-3

La composition du sébum justifie que cette étude soit centrée sur l'oxydation des acides gras dans un premier temps suivi de l'étude approfondie de l'oxydation du squalène car il s'agit bien des constituants majoritaires du film lipidique à la surface de la peau.

Ce premier chapitre a pour objectif de dresser un état de l'art des différentes voies d'oxydation des acides gras insaturés, notamment des acides oléique, linoléique et linoléique, plus largement étudiés que le squalène. Ainsi, nous y décrirons les mécanismes d'oxydation et de dégradation communs à l'ensemble des composés insaturés (acide gras ou terpènes) que ce soit au contact de l'oxygène fondamental ou l'oxygène singulet, état excité de $^3\text{O}_2$.

I.1. Oxydation des acides gras insaturés : Etat de l'art

I.1.1. Les acides gras : analyse bibliométrique

Les **acides gras**, omniprésents dans la nature, ont été le sujet de nombreuses publications dans des domaines divers et variés comme le montrent les 364 324 documents référencés par ce terme dans la base de données *Scifinder*[®]. En centrant les recherches sur les **acides gras insaturés** on n'en dénombre plus que 3 266. La figure 3 ci-dessous représente les principaux domaines concernés par les acides gras insaturés. On constate que « **l'oxydation** » représente une part relativement importante : 17%.

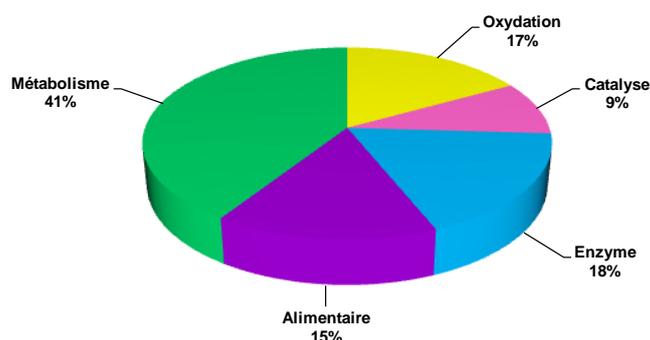


Figure 3 : Principaux domaines d'études des acides gras insaturés (« *unsaturated fatty acid* ») d'après la base de données *Scifinder*[®].

Une étude plus approfondie des termes indexés aux différents documents concernant les acides gras insaturés révèle que les mots clés les plus enregistrés après « **fatty acids** » sont « **metabolism** » et « **animals** » ce qui montre bien l'importance de l'étude des lipides dans le cadre des métabolismes du vivant. Les mots clés « **food** » ou « **oxidation** » représentent respectivement 3 et 9% des références sur *Scifinder*[®].

L'acide gras insaturé le plus souvent considéré est l'**acide oléique**, suivi de l'**acide linoléique**, de l'**acide arachidonique** et de l'**acide linoléique**.¹¹ Le nombre élevé d'études (>17 000 références) s'explique par leur omniprésence dans le domaine du vivant en particulier comme constituants majoritaires des membranes cellulaires. L'étude des mécanismes de peroxydation des lipides en présence d'oxygène connaît un regain d'intérêt depuis ces dernières décennies, notamment à cause de

son implication et de ses conséquences dans le domaine de la nutrition et de la santé. L'examen de ces phénomènes a été la base de la compréhension de certaines pathologies (les maladies neurodégénératives par exemple) mais également de la résolution des problèmes industriels grâce à l'utilisation d'antioxydants.³ L'ensemble de la littérature sur le sujet, et plus particulièrement celle sur l'oxydation des lipides insaturés, constitue une base de données riche et utile à l'élucidation des mécanismes de peroxydation des (poly)terpènes.

1.1.2. Oxydation des acides gras insaturés

La diversité des processus biologiques et des produits dans lesquels on retrouve les acides gras leur confère une place centrale dans le domaine de l'oxydation que ce soit par réaction directe avec l'oxygène de l'air ou par l'intermédiaire d'enzymes.

1.1.2.1. Oxydation par l'oxygène moléculaire 3O_2

L'oxydation d'un composé résulte de sa combinaison avec l'oxygène. On parle plus précisément d'autoxydation lorsque l'oxygène atmosphérique réagit de façon autocatalytique selon un mécanisme radicalaire. L'autoxydation des acides gras insaturés représente 1580 références. La figure 4 illustrant le nombre de documents, tous confondus (journaux, brevets...), en fonction des années, montre qu'une constante augmentation est visible depuis les années 1970. Ces documents concernent majoritairement l'oxydation des aliments et notamment celle des huiles et aux conséquences sur la santé ou leur stockage.

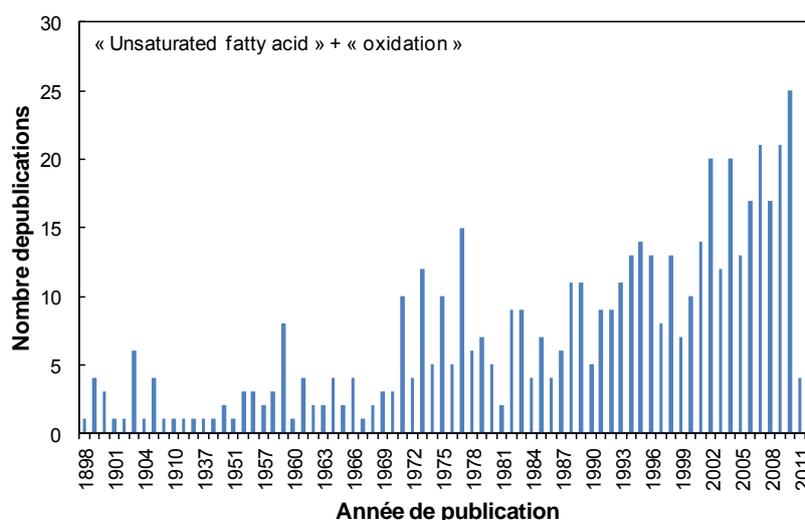


Figure 4 : Nombre de publications associant « unsaturated fatty acid » et « oxidation » en fonction des années de parution.

Par ailleurs, la recrudescence de l'intérêt portée à l'oxydation des acides gras insaturés depuis les dernières décennies est marquée également par le nombre de brevets qui se sont démultipliés depuis 1997. Aujourd'hui un peu moins de 600 brevets sont à dénombrer sur le sujet, principalement dans les domaines de l'alimentaire, des matières premières industrielles et de la cosmétique.

De nombreux facteurs peuvent influencer la réaction de l'oxygène avec les acides gras insaturés, c'est pourquoi de nombreuses études industrielles ont été réalisées afin d'enrayer les dégradations résultantes altérant les propriétés finales des produits. L'un des principaux facteurs est la lumière. En effet, l'autoxydation des acides gras insaturés peut également être favorisée sous l'action des rayonnements UVs, d'où les 216 références concernant l'oxydation des acides gras insaturés par voie photochimique. D'autres catalyseurs existent tels que les enzymes ou les ions métalliques et représentent une grande partie des références sur le sujet.

1.1.2.2. Oxydation catalysée par les enzymes

Les enzymes sont des protéines ayant un pouvoir catalytique associé à une très grande spécificité puisque chaque enzyme catalyse une réaction donnée par interaction avec le substrat selon un mécanisme « clé-serrure » développé par Fischer.¹²

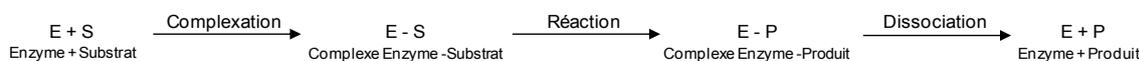


Schéma 1 : Réaction d'une enzyme en présence d'un substrat cible.¹²

L'étude de la réactivité enzymatique sur les acides gras, débutée au XXème siècle, représente aujourd'hui 18% de l'ensemble des documents. De même que pour l'étude de l'autoxydation des lipides, on peut constater que l'augmentation des recherches sur le sujet débute dans les années 1970 pour atteindre son maximum en 2001. Ces données sont à mettre en relation avec l'apparition des biotechnologies et le renforcement de l'intérêt porté aux biosciences.¹³

Au sein des plantes, la lipoxygénase est une des enzymes oxydantes responsable de la formation des hydroperoxydes d'acide gras insaturés. La première publication sur cette enzyme date de 1946 et concernait l'oxydation des acides gras végétaux.¹⁴ Il faudra attendre le milieu des années 1970 afin de voir le premier article étudiant la lipoxygénase au sein d'un métabolisme humain. C'est à ce même moment que la voie de la lipoxygénase (schéma 2) a été décrite afin d'expliquer la dégradation oxydante des acides gras insaturés,¹⁵ que ce soit pour l'obtention de COVs odoriférants chez les végétaux, pour la dégradation des huiles ou au sein de métabolismes humains à l'échelle cellulaire.

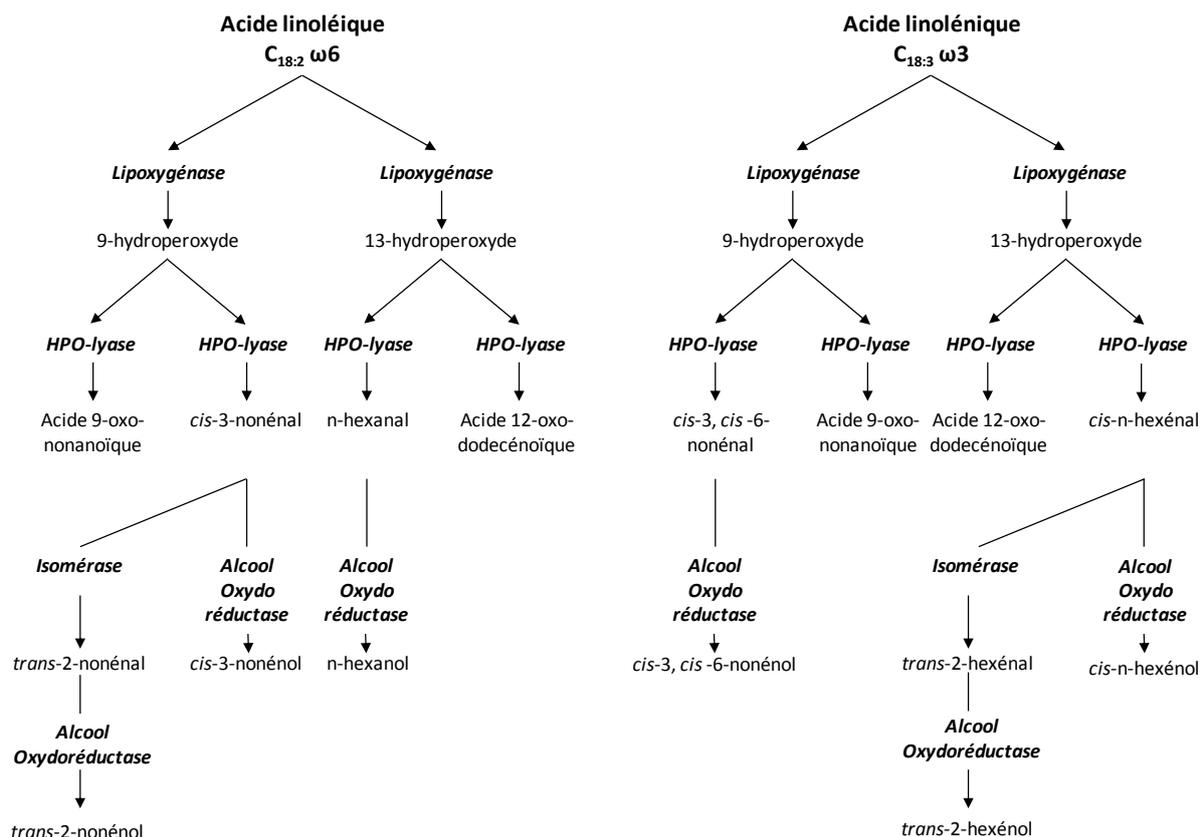


Schéma 2 : Voie de la lipoxygénase pour l'acide linoléique et linoléique.¹⁶

Cependant, chaque enzyme étant spécifique, le nombre de réactions associées n'en est que plus important. Ainsi, on trouve des enzymes capables de cliver spécifiquement des molécules telles que les hydroperoxyde-lyases qui catalysent la décomposition des hydroperoxydes d'acide gras ou encore les hydrolases catalysant le clivage de certaines liaisons C-O, C-C ou C-N. On peut également citer en exemple les lipases qui regroupent l'ensemble des enzymes utilisées pour catalyser des synthèses asymétriques (hydrolyse, estérification,...). On les retrouve notamment dans les lessives pour la dégradation des salissures d'origine biologique et les fibrilles de coton.¹⁷ Elles servent également à la transformation des triglycérides en glycérol et en acides gras. Les estérases, quand à elles, regroupent celles utilisés pour synthétiser des composés avec une chiralité définie à partir de mélanges racémiques d'esters.¹⁸ Les levures de boulanger sont des enzymes très peu chères et sont des réactifs microbiologiques pour la synthèse organique. On les retrouve médiateur d'un certain nombre de biotransformations telles que la réduction des groupes carbonyles, l'oxydation ou encore la cyclisation de substrats à base de squalène.¹⁹

Aux vues de la variété d'enzymes existantes, aujourd'hui, elles prennent toute leur importance dans les bio synthèses à des fins industrielles ou encore dans la modification des huiles et des graisses afin de les rendre bénéfiques pour la santé. Ainsi on peut dénombrer 442 brevets associant les acides gras insaturés et les enzymes. Par exemple, en 2008, BASF déposa un brevet concernant la production préférentielle d'acide arachidonique au sein de plantes transgéniques car cet acide gras insaturé est

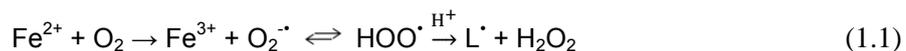
connu pour diminuer le cholestérols, la pression artérielle et ainsi de diminuer les risques d'attaque cardiaque.²⁰

1.1.2.3. Oxydation catalysée par des métaux

L'oxydation des lipides est reconnue pour avoir d'importantes répercussions physiologiques et toxicologiques dans le domaine biologique. Le rôle des métaux en tant que principaux catalyseurs de l'oxydation des lipides dans les systèmes biologiques est connu depuis des décennies leur conférant une place importante au sein des recherches sur ce sujet.²¹ Dès 1903, Herbert et al. publiaient dans *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences* sur l'effet des métaux dans le chauffage des acides gras.²²

Les années 80 ont montré un regain d'intérêt pour le sujet, après des décennies de constance. On peut associer cette croissance du nombre de publications à la compréhension des allergies causées par les métaux. Le nickel est de loin le plus étudié dans ce contexte, suivi par le fer et le cobalt. En 2012, le manganèse et le molybdate deviennent les plus étudiés de même que les complexes à base de tungstène.

L'ensemble de ces métaux, à l'état de traces dans la plupart des produits à base d'acides gras insaturés catalyse leur autoxydation par la formation de radicaux dans le milieu. Ainsi, le fer par exemple, réagit avec l'oxygène moléculaire de l'air pour former des ions superoxydes $O_2^{\cdot -}$ (équation 1.1) très réactifs ou en présence de peroxydes pour former des radicaux alcoyles selon la réaction de Fenton (équation 1.2). Des hydroperoxydes sont également formés.



Le fer n'est bien entendu pas le seul métal catalysant l'oxydation des acides gras insaturés. En fonction de la valence des métaux, l'activité catalytique ne sera pas basée sur les mêmes mécanismes, c'est ce que nous développerons dans la suite de ce chapitre 1.

L'association d'ions métalliques et d'acides gras insaturés n'a pas que des effets néfastes tels que l'initiation d'une dégradation oxydante par exemple. Les 1 373 brevets répertoriés sur *Scifinder*[®] soulignent leur importance industrielle. En effet, l'oxydation des acides gras insaturés catalysée par des ions métalliques présente également un réel intérêt dans le domaine des revêtements et des enrobages à base de résines alkyles.²³

I.2. Autoxydation des acides gras insaturés

I.2.1. Mécanisme d'autoxydation

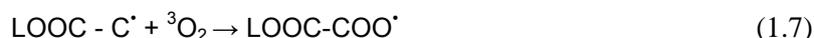
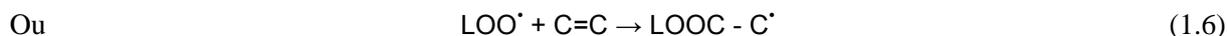
Les réactions chimiques qui se produisent spontanément à température ambiante entre l'oxygène atmosphérique $^3\text{O}_2$ et des composés organiques sont généralement référencées sous le terme d'autoxydation. Elles suivent un mécanisme radicalaire établi au début du XX^{ème} siècle.²⁴ La majorité des composés concernés par l'autoxydation sont les composés insaturés.²⁵

La réaction du dioxygène O_2 avec des lipides insaturés (LH), très fréquente dans l'alimentaire ou dans les processus biologiques, implique un mécanisme radicalaire composé de trois étapes : initiation, propagation et terminaison (schéma 3).²⁶ L'initiation est engendrée par la perte d'un hydrogène en présence de traces de métaux, de lumière ou de chaleur (équation 1.3). Le radical lipidique résultant (L^\bullet) réagit avec l'oxygène pour former des radicaux peroxydes (LOO^\bullet) (équation 1.4). Lors de l'étape de propagation, LOO^\bullet réagit avec LH pour former des hydroperoxydes d'acide gras (LOOH) qui sont les produits primaires de l'autoxydation (équation 1.5). Le taux de formation des hydroperoxydes et des radicaux alcoxydes dépend uniquement de l'oxygène disponible et de la température.²⁷

Initiation



Propagation



Terminaison

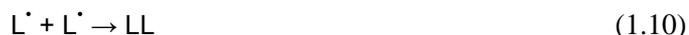


Schéma 3 : Etapes d'initiation, de propagation et de terminaison d'un mécanisme radicalaire en chaîne classique d'oxydation des lipides.²⁸

Le produit initial de cette réaction est donc un hydroperoxyde (LOOH) (équation 1.5). Son instabilité et sa réactivité chimique sont responsables de sa décomposition en une variété de produits secondaires,

dont certains catalysent le processus d'oxydation²⁵ compliquant ainsi l'étude des mécanismes. La cinétique d'autoxydation mesurée par l'absorption d'O₂ ou le suivi de la concentration de LOOH présente une période d'induction pendant laquelle les hydroperoxydes s'accablent, puis leur décomposition deviennent importantes et accélère l'oxydation (figure 5) : on parle de réaction autocatalytique.

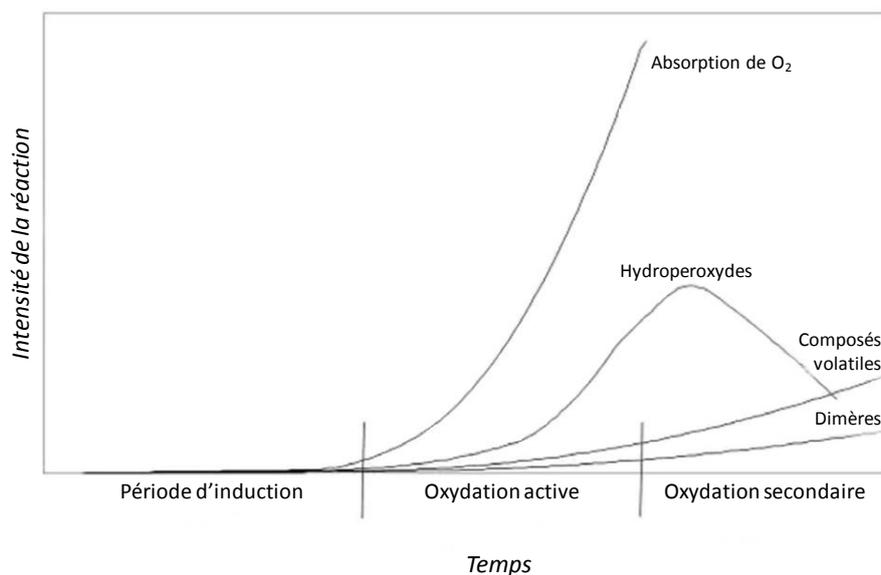


Figure 5 : Intensité de l'oxydation des lipides insaturés en fonction du temps.²⁵

Dans la plupart des cas, l'autoxydation est considérée comme une réaction spontanée, ce qui n'est pas le cas en réalité. En effet, thermodynamiquement, l'oxygène ne peut pas réagir directement avec les doubles liaisons des acides gras insaturés d'après la règle de conservation des spins de Wigner. L'oxygène fondamental est dans un état triplet (³O₂) car il présente deux électrons avec des spins parallèles dans deux orbitales π* séparées ; la double liaison, quant à elle est dans un état singulet (les deux électrons sont de spins opposés mais dans la même orbitale).²⁸ Afin que la réaction puisse se faire entre les deux composés, il est nécessaire de faire agir un élément extérieur qui va permettre soit de faire passer l'oxygène dans un état singulet (¹O₂), soit d'arracher ou d'ajouter un électron ou un H[•] au substrat organique. Ainsi, l'oxydation des lipides selon les processus (¹O₂ + C=C) ou (³O₂ + R) pourra avoir lieu. L'énergie nécessaire pour arracher un atome d'hydrogène à un composé organique dépend fortement de la position de l'hydrogène dans la molécule. L'atome hydrogène allylique adjacent à la double liaison est le plus labile et plus particulièrement si l'atome d'hydrogène est doublement allylique. C'est le cas des hydrogènes bis allyliques des acides linoléique et linoléinique.

Les rayonnements UV de la lumière peuvent également induire la formation du radical durant l'étape d'initiation. En effet, à des longueurs d'ondes inférieures à 400 nm, l'énergie des photons correspondante est alors suffisante pour activer la scission L-H ($E_a \sim 98.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$) ou L-L ($E_a \sim 83.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$) d'un lipide (tableau 2).

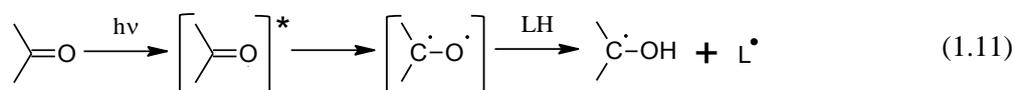
Liaison	Energie de dissociation des liaisons ΔE		λ^* (nm)
	kJ.mol^{-1}	kcal.mol^{-1}	
C=C	612	146	195
O-H	463	111	257
C-H	412	99	289
C-O	360	86	331
C-C	348	83	342
C-N	305	73	390
O-O	157	35	759

* Calculée à partir de $E = Nhc/\lambda$, où $N = 6,02 \cdot 10^{23}$ photons.mol⁻¹, $h = 6,6 \cdot 10^{-34}$ J.s, $c = 3 \cdot 10^{17}$ nm.s⁻¹, $\lambda =$ longueur d'onde en nm.²⁹

Tableau 2 : Energies de dissociation, associées aux longueurs d'ondes correspondantes, des liaisons organiques typiques.²⁸

Contrairement à ce que l'on pourrait s'attendre, les doubles liaisons ne représentent pas des cibles réelles des UV. L'énergie de transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de diènes conjugués est de 560 kJ.mol⁻¹ et celle d'une double liaison isolée est de 680 kJ.mol⁻¹ ce qui est uniquement accessible dans la limite basse des longueurs d'ondes (< 180 nm).³⁰ Toutefois, il est à noter que les acides gras insaturés sont plus sensibles aux UV que les esters car les liaisons C-C et C-H en α de -COOH sont activées de 5 à 8 kcal.mol⁻¹ par effet mésomère.

La production des radicaux L[•] directement par des longueurs d'ondes inférieures à 400 nm n'est pas facilement réalisable sauf lorsque l'échantillon est chauffé.³⁰ Le premier mécanisme par lequel les radiations UV initient l'oxydation des lipides est indirecte, passant par une scission homolytique de certains hydroperoxydes pour générer des initiateurs libres tels que LO[•] et HO[•] qui vont alors arracher des hydrogènes à des molécules lipidiques et ainsi former les radicaux L[•] *ab initio*. Une deuxième source de radicaux est l'excitation des composés carbonylés par les UVs (équation 1.11).³¹



La seconde étape, la propagation, est une étape qui peut se révéler complexe. En général lors d'un processus radicalaire en chaîne, cette étape inclue : **1)** le couplage du radical, **2)** le transfert d'un atome, **3)** la fragmentation, **4)** le réarrangement et **5)** la cyclisation³² (schéma 4).

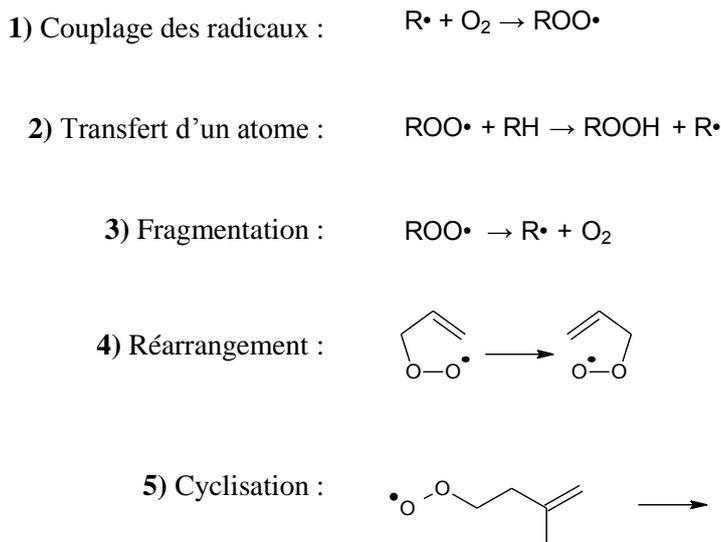


Schéma 4 : Différentes réactions de propagation possibles en autoxydation.³²

Lorsqu'un radical réagit avec un autre radical, une espèce non radicalaire est alors produite et la réaction est stoppée : il s'agit alors de l'étape de terminaison.

1.2.2. Acides oléique, linoléique et linoléinique

Les acides oléique, linoléique et linoléinique (figure 6), majoritaires dans les huiles, sont au cœur de la plupart des études réalisées sur le sujet.

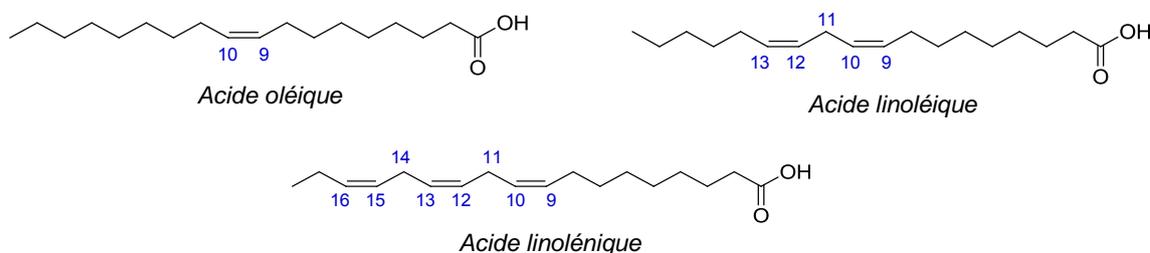


Figure 6 : Structure des acides oléique, linoléique et linoléinique.

Le mécanisme le plus probable d'autoxydation de l'acide oléique implique l'arrachement d'un hydrogène sur les carbones 8 et 11, donnant deux radicaux allyliques délocalisés ($C=C-C\cdot \leftrightarrow \cdot C-C=C$). Ces intermédiaires radicalaires réagissent avec l'oxygène pour produire un mélange de 4 hydroperoxydes allyliques en positions 8, 9, 10 et 11. Les hydroperoxydes sur C_8 et C_{11} sont toujours légèrement plus abondants que les hydroperoxydes en position 9 et 10. La différence entre ces deux paires d'isomères est de 11% quand l'acide oléique est autoxydé à 40 °C mais $\leq 6\%$ à 80 °C. Cette différence est due à une attaque de l'oxygène plus abondante sur les carbones 8 et 11 que sur les carbones 9 et 10 qui requièrent un réarrangement.³³

Ainsi, l'autoxydation de composés mono-insaturés, cas de l'acide oléique, conduit à la formation de six hydroperoxyacides (figure 7). Le processus d'autoxydation peut facilement être identifiable par la présence des *cis* hydroperoxyacides allyliques, qui en sont des produits spécifiques.³⁴

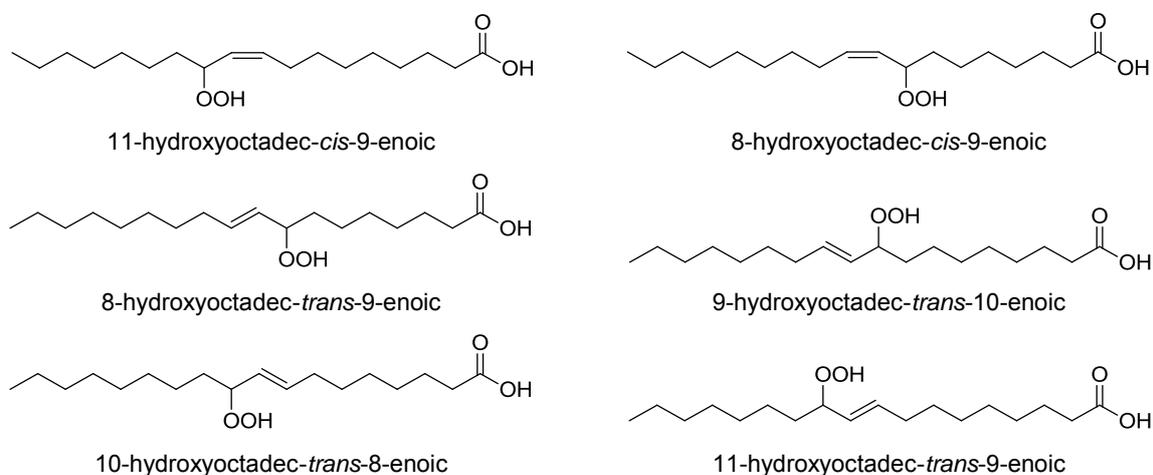


Figure 7 : Structure chimique des hydroperoxyacides résultant de l'autoxydation de l'acide oléique.³⁴

Dans le cas des acides gras di-insaturés, l'arrachement de l'hydrogène bis allylique sur le carbone 11 produit un radical pentadiényle délocalisable.²⁶ Ces intermédiaires radicalaires réagissent avec l'oxygène pour produire un mélange d'hydroperoxydes en position 9 et 13 présentant deux doubles liaisons conjuguées (figure 8).³²

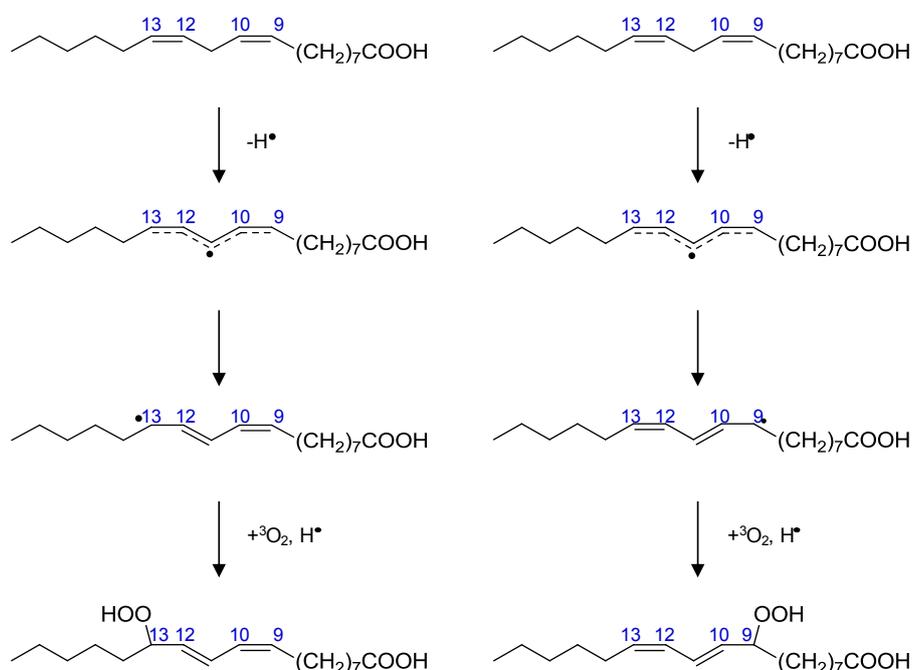


Figure 8 : Formation des hydroperoxydes en positions 9 et 13 par autoxydation de l'acide linoléique.²⁶

Le calcul des énergies des liaisons C-H de l'acide linoléique³⁵ permet de conforter le radical qui sera le plus facilement formé par arrachement d'un hydrogène. Alors que l'énergie pour une chaîne saturée est égale à 100 kcal.mol⁻¹, l'hydrogène bis allylique en position 11, ne requière que 50 kcal.mol⁻¹. L'étude des produits obtenus à partir de l'acide linoléique par Bergstrom et al. a permis de révéler la formation des hydroperoxydes en positions 9 et 13 tandis que l'hydroperoxyde formé sur C₁₁ n'a pas été détecté (formé en trop petite quantité ou trop instable pour être isolé).³⁶ En 2000, Brash a associé différentes techniques analytiques telles que la CLHP, la CG-SM et la RMN pour isoler cet hydroperoxyde bis-allylique à partir du linoléate de méthyle.²⁴ L'oxygène attaque de manière égale les positions 9 et 13 pour former des hydroperoxydes isomères avec des configurations *trans* et *cis*.

Pour les lipides tri-insaturés, tel que l'acide linoléique, les hydrogènes des deux méthyles actifs des carbones 11 et 14 sont arrachés pour produire deux radicaux pentadiényles. Ces intermédiaires réagissent avec l'oxygène pour entraîner la formation d'un mélange d'hydroperoxydes diènes et triènes conjugués en position 9-, 12-, 13- et 16. Les hydroperoxydes en position 9 et 16 sont formés en plus haute proportion que les isomères en position 12 et 13. Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer cette réduction du taux des hydroperoxydes en positions 12 et 13 dans le milieu³³ :

- (a) Les carbones 9 et 16 sont moins encombrés,
- (b) Les hydroperoxydes 12 et 13 se décomposent plus facilement,
- (c) Les hydroperoxydes 12 et 13 subissent soit une cyclisation [1,4] ou une cyclisation [1,3] pour former des endoperoxydes.

De manière générale, tous les hydroperoxydes lipidiques peuvent encore réagir avec l'oxygène pour former des produits d'oxydation secondaires tels que les époxyhydroperoxydes, les cétohydroperoxydes, les di-hydroperoxydes, les peroxydes cycliques ou des endoperoxydes bicycliques (figure 9). Ces produits secondaires peuvent être décomposés comme les hydroperoxydes pour donner des produits volatils. Les hydroperoxydes ou radicaux peroxydes peuvent également se condenser en dimères ou polymères qui peuvent à leur tour être décomposés en matériaux volatils.²⁸

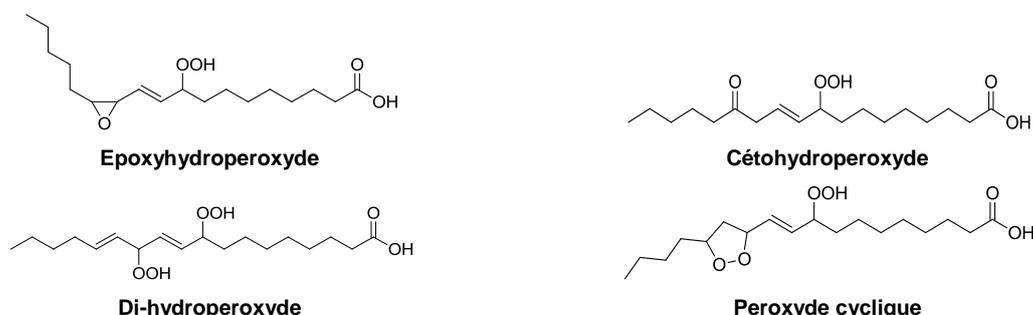


Figure 9 : Exemple des structures chimiques des produits secondaires d'oxydation formés par les hydroperoxydes d'acide linoléique avec l'oxygène.^{28,37}

1.2.3. Facteurs influençant l'autoxydation des lipides

L'oxydation des huiles est influencée par un grand nombre de facteurs tels que leur composition en acides gras, la chaleur ou l'énergie lumineuse, la concentration et la configuration électronique du dioxygène ($^3\text{O}_2$ ou $^1\text{O}_2$), les pigments et les anti-oxydants. Ces facteurs affectent l'oxydation des huiles mais il n'est pas facile de différencier les effets de chacun car leur action est souvent simultanée.

➤ *Le type d'acides gras composants les huiles*

Les huiles les plus insaturées sont celles qui s'oxydent le plus rapidement. En effet, la vitesse de formation du radical lipidique dépend principalement du type d'acide gras.²⁷ Or, l'arrachement d'un hydrogène par un radical libre se produit préférentiellement sur les liaisons C – H les plus faibles. L'ordre de réactivité est : H bis allylique entre deux doubles liaisons > H allylique en position α d'une double liaison >> H en position α de la fonction carboxylique > H méthylénique. Les vitesses relatives d'autoxydation des acides oléiques, linoléiques et linoléniques ont été reportées dans le tableau 3.

Acide Gras	Nombre d'insaturations	Position n dans la chaîne	Vitesse de réaction ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Acide stéarique	0	0	$1,2 \times 10^4$
Acide oléique	1	9	$5,3 \times 10^4$
Acide linoléique	2	9 : 12	$7,3 \times 10^4$
Acide linoléniq	3	9 : 12 : 15	$10,0 \times 10^4$

Tableau 3 : Vitesse d'autoxydation des acides gras saturé, mono- di- et tri-insaturés.³⁸

➤ *La température et la lumière*

L'autoxydation des huiles augmente avec la température.²⁵ La lumière à faibles longueurs d'onde a des effets plus préjudiciables sur les huiles que les grandes longueurs d'ondes puisqu'elle permet le clivage des liaisons C=C, C – H ou C – C comme indiqué dans le tableau 2.

➤ *L'oxygène*

L'oxydation des huiles commence dès lors que les acides gras, l'oxygène et les catalyseurs sont en contact. Plus il y a d'oxygène solubilisé dans le milieu, plus l'oxydation de l'huile sera importante. La concentration en oxygène dans une huile est proportionnelle à la pression partielle en oxygène à la surface de l'huile.³⁹ A l'air libre, la pression partielle de l'oxygène à la surface d'un liquide est de 0,21 atm. La quantité d'oxygène diluée est alors de l'ordre du ppm. L'effet de la concentration en oxygène sur l'oxydation des huiles augmente avec l'élévation de la température, la présence de lumière ou encore de métaux tels que le fer ou le cuivre.²⁵

➤ *Les composés mineurs présents dans les huiles*

▪ Les acides gras libres

L'huile brute contient des acides gras libres plus sensibles à l'autoxydation que les acides gras estérifiés. Ils serviront donc de pro-oxydants dans les huiles alimentaires. La présence de groupes hydrophiles et hydrophobes dans la même molécule pousse les acides gras à se concentrer à la surface de l'huile brute. Les groupements carboxyliques hydrophiles ne vont pas se diluer facilement dans l'huile et préféreront donc rester à la surface. Ainsi ils diminuent la tension de surface et augmentent la diffusion de l'oxygène dans le milieu accélérant l'oxydation de l'huile.^{40, 41} Par ailleurs, la présence d'oxoacide permet la formation de radicaux qui catalysent l'oxydation des graisses.⁴²

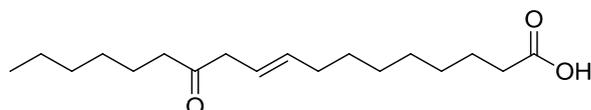


Figure 10 : Structure chimique d'un oxoacide formé par autoxydation de l'acide linoléique.

▪ Les métaux

Les métaux augmentent la vitesse d'oxydation des huiles en diminuant l'énergie d'activation nécessaire à l'étape initiale entre 63 et 104 kJ.mol⁻¹. Le cuivre accélère la décomposition des hydroperoxydes et du peroxyde d'hydrogène 50 fois plus vite que les ions ferreux Fe²⁺, qui eux agissent 100 fois plus vite que les ions ferriques Fe³⁺.²⁸

▪ Les antioxydants

Les huiles alimentaires contiennent naturellement des antioxydants tels que le tocophérol, le tocotriénol, les caroténoïdes, des composés phénoliques et les stérols. Ces composés mineurs jouent un rôle majeur dans la contribution à la stabilité des huiles.⁴³ Ils sont parfois intentionnellement ajoutés aux huiles afin d'accroître leur stabilité face à l'oxydation. Les antioxydants sont des composés qui permettent d'étendre la période d'induction de l'oxydation ou d'en diminuer la vitesse. Ils captent les radicaux libres, contrôlent les métaux de transition, désactivent l'oxygène singulet et inhibent les sensibilisateurs. Les agents de chélation tels que l'acide phosphorique, l'acide citrique, l'acide ascorbique et l'EDTA inhibent l'oxydation des huiles par une voie indirecte.⁴⁰ En effet, ils peuvent convertir les ions ferriques et les ions cuivriques en complexes insolubles et empêcher stériquement la formation de complexes entre les métaux et les hydroperoxydes d'acides gras.

I.3. Oxydation des lipides par l'oxygène singulet

I.3.1. L'oxygène singulet 1O_2

I.3.1.1. Formation de l'oxygène singulet par voie photochimique

La photooxydation fournit l'état de spin nécessaire pour permettre à l'oxygène de réagir avec les doubles liaisons, en modifiant l'oxygène d'un état triplet à un état singulet ou en arrachant un électron à la molécule à oxyder. La lumière visible (> 400 nm) n'apporte pourtant pas l'énergie nécessaire pour produire directement des radicaux²⁸ à partir des molécules organiques courantes (tableau 2). Néanmoins, lorsqu'elle est absorbée par des sensibilisateurs, elle induit leur excitation puis cette énergie est transférée aux liaisons pour former des radicaux libres par une réaction de transfert d'électron (Type I) ou à la molécule d'oxygène pour former de l'oxygène singulet qui sera par la suite additionné sur les doubles liaisons des acides gras insaturés par un processus non radicalaire (Type II). Les réactions de type I sont des réactions d'oxydation tandis que les réactions de type II sont des réactions d'oxygénation et se trouvent être 1500 fois plus rapides que celles mettant en jeu de l'oxygène dans son état fondamental.⁴⁴

Type I sensibilisation (radicaux libres) $\rightarrow L^* \rightarrow LOOH$

Type II sensibilisation (formation d'oxygène singulet, 1O_2) $\rightarrow LOOH$

Le sensibilisateur S ne doit pas participer à la réaction. Une fois dans son état triplet excité, $^3S^*$ promeut l'oxydation par les mécanismes de type I et de type II. Le mécanisme de type I implique l'arrachement d'un atome d'hydrogène ou un transfert d'électron entre le sensibilisateur excité et le substrat, conduisant à la production d'un radical libre. Ces radicaux peuvent réagir avec l'oxygène pour former une espèce active telles que l'anion radicalaire superoxyde $O_2^{\cdot-}$ ⁴⁵ ou initier une réaction radicalaire en chaîne.⁴⁶ Dans un mécanisme de type II, l'oxygène singulet est généré par le transfert d'énergie de $^3S^*$ à la molécule d'oxygène.⁴⁷ Une molécule de sensibilisateur peut produire de 10^3 à 10^5 molécules d'oxygène singulet avant dégradation.⁴⁸ La photooxydation ne s'effectue donc pas exclusivement selon un mécanisme car les deux sont en compétition (schéma 5).

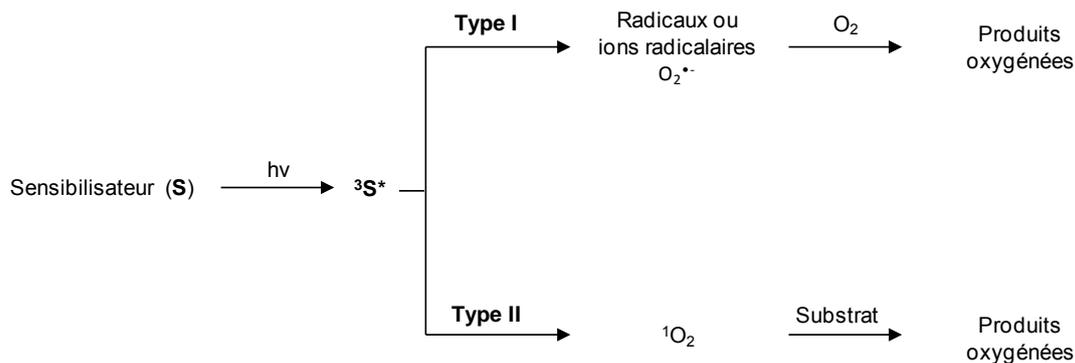


Schéma 5 : Les deux voies nommées Type I et Type II de la photooxydation.

Par la voie photochimique, l'oxygène singulet est donc produit grâce à la combinaison entre la lumière et un sensibilisateur.⁴⁵ Le diagramme de Jablonski, illustré figure 11, met en forme l'ordre des niveaux d'énergie et les processus photophysiques impliqués lors de la photooxydation.

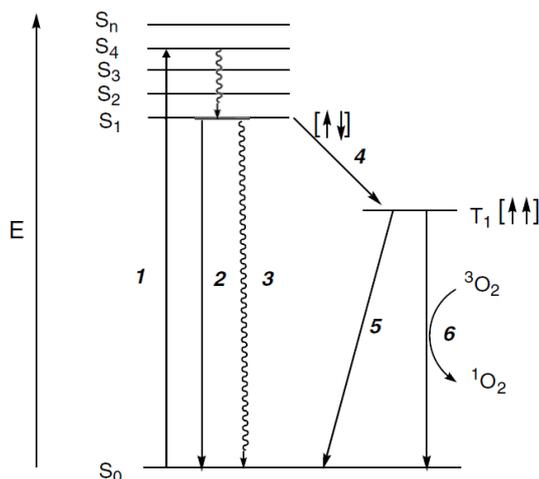


Figure 11 : Diagramme de Jablonski modifié décrivant les processus photophysiques : 1. Absorption ; 2. Fluorescence ; 3. Conversion interne ; 4. Inter-conversion ; 5. Phosphorescence ; 6. Formation de l'oxygène singulet 1O_2 par transfert d'énergie du T_1 du photosensibilisateur à l'oxygène triplet 3O_2 .⁴⁹

A une région de longueurs d'ondes spécifiques (visible ou UV), le photosensibilisateur, dans son état fondamental S_0 , absorbe un photon d'énergie pour atteindre un état excité S_n^* . L'état excité peut subir une transition sans radiation entre les états d'une même multiplicité appelé *conversion interne* (3) pour retourner à l'état fondamental S_0 ou conserver un état excité mais de plus faible énergie donc plus stable S_1 . Cet état excité a une durée de vie courte et peut suivre deux voies. La première consiste retourner à l'état fondamental en émettant l'énergie absorbée (2) ; il s'agit de la *fluorescence*. La seconde est une relaxation non radiative se produisant lors d'un croisement inter-système (4) vers le premier état triplet excité T_1 ou $^3S^*$. Cette transition, entraînant le changement de la multiplicité en passant de spins anti-parallèles à des spins parallèles est interdite mais un bon photosensibilisateur peut y accéder. L'état excité T_1 a une durée de vie longue. La rencontre entre $^3S^*$ et l'oxygène

moléculaire $^3\text{O}_2$ entraîne un changement de spins produisant un état excité singulet de l'oxygène ($^1\text{O}_2$, $^1\Delta_g$) tandis que le photosensibilisateur retourne à l'état fondamental (**6**). Cet état excité de la molécule d'oxygène est le principal médiateur de la photooxydation et peut réagir directement avec les composés insaturés sans former d'intermédiaires radicalaires pour donner des hydroperoxydes. A partir de T_1 , le photosensibilisateur peut aussi retourner à l'état fondamental par un déclin radiatif appelé *phosphorescence* (**5**).^{1, 45, 49}

Les conditions favorisant le mécanisme de type II sont : **1**) une faible concentration en sensibilisateur, **2**) un rendement quantique élevé pour le croisement inter-système du sensibilisateur et **3**) une faible réactivité du sensibilisateur dans son état triplet. Le choix du sensibilisateur est important. Il a été montré par exemple que la benzophénone favorise la formation d'époxydes au détriment des hydroperoxydes.⁵⁰

L'oxygène singulet peut également être formé par la voie chimique, élaborée par Aubry en 1985. L'état excité de l'oxygène est obtenu par un système peroxyde d'hydrogène/molybdate.⁵¹⁻⁵⁴ Cette voie, inutilisée dans le cadre des acides gras insaturés, sera détaillée dans le chapitre 2.

1.3.1.2. Réactivité de l'oxygène singulet en présence de composés insaturés

L'oxygène singulet étant dans un état excité, il peut être désactivé pour retourner à son état fondamental. Trois phénomènes peuvent l'amener à retourner sous sa forme triplet : **(1)** la désactivation radiative par le solvant avec émission de photons et une constante de vitesse k_d , **(2)** la désactivation chimique au contact d'un substrat produisant une nouvelle molécule oxygénée avec une constante de vitesse k_r et **(3)** la désactivation physique, non radiative, par un transfert d'énergie avec une autre molécule sans pour autant altérer la nature chimique de celle-ci telle que le solvant (k_q) (schéma 6).

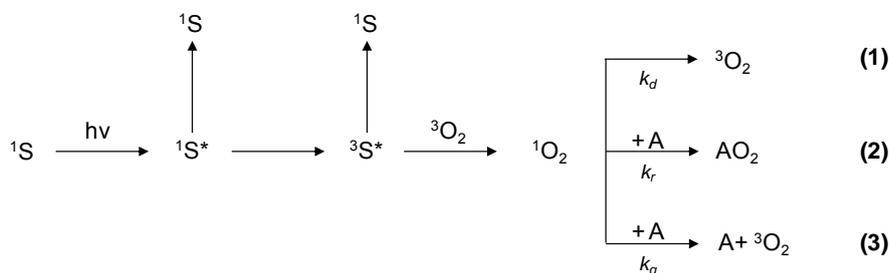


Schéma 6 : Voies de désactivation de l'oxygène singulet.^{2, 55, 56}

La compétition entre **(1)** et **(2)**, prédominante, est définie par le coefficient de réactivité de Foote, β , correspondant au ratio de k_d sur k_r .⁵⁶ L'oxygène singulet a une durée de vie de 10^{-6} à 10^{-3} secondes en

solution⁵⁷ fortement influencée par un certains nombres de paramètres dont le solvant (tableau 4). Cependant, il présente une importante réactivité pour les composés organiques riches en électrons.

Solvant	Singlet oxygen lifetime (s)
Acetone	5.1×10^{-5}
Methanol	7×10^{-6}
Dichloromethane	9.1×10^{-5}

Tableau 4 : Durée de vie de l'oxygène singlet dans différents solvants.

Cet état métastable de l'oxygène réagit avec les doubles liaisons riches en électrons pour former des hydroperoxydes (par une « ène » réaction), des endoperoxydes (par une cycloaddition [2+4]) ou des dioxétanes (par une cycloaddition [2+2]) (schéma 8).^{2, 58, 59, 60}

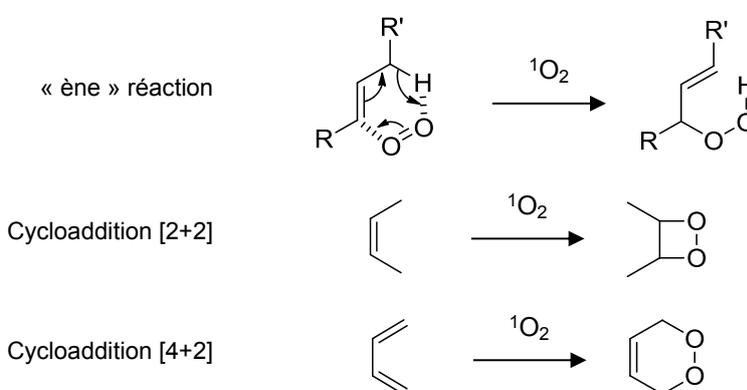


Schéma 7 : Réactions de l'oxygène singlet 1O_2 avec une double liaison.⁶¹

La "ène" réaction fait intervenir l'addition de l'oxygène et l'arrachement d'un hydrogène du système π de l'oléfine^{60, 62} induisant le déplacement de la double liaison (schéma 7).⁶³

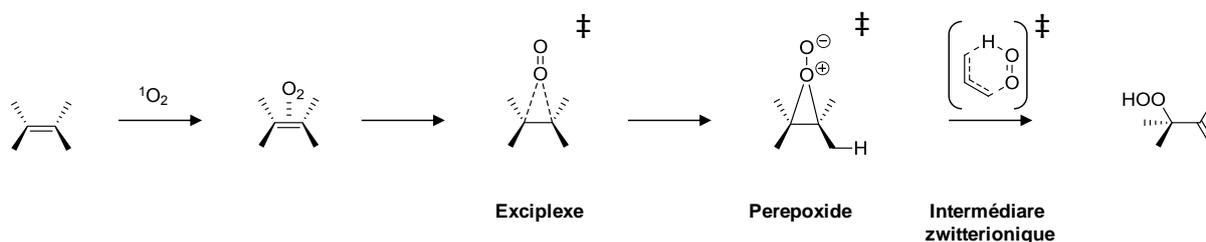
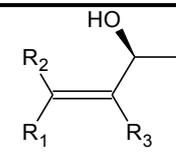


Schéma 8 : Détail du mécanisme de « ène » réaction avec les intermédiaires formés.^{39 62}

Stereochimiquement parlant, l'oxygène singlet a la capacité d'arracher l'hydrogène du site le plus encombré de l'oléfine.⁶² Nardello et al. ont déterminé par photolyse éclairée les valeurs des constantes de vitesse ($k_r + k_q$) ainsi que la valeur de β pour une série de différents alcools allyliques (tableau 5) démontrant ainsi cette tendance. Ce phénomène, connu comme étant « l'effet *cis* », a été pour la première fois décrit par Foote.³⁹ Néanmoins, dans les acides gras, les deux sites de la double liaison

ont le même encombrement c'est pourquoi la même quantité de chacun des deux hydroperoxydes possibles est formée.^{40, 64}

			$(k_r + k_q)$ $(10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})^a$	β $(\text{M})^b$
R^1	R^2	R^3		
CH ₃	CH ₃	H	2,4	0,43
H	CH ₃	CH ₃	14	0,074
CH ₃	H	CH ₃	18	0,058
CH ₃	CH ₃	CH ₃	320	0,0032

Conditions : ^a Dans CD₃OD, tétraphénylporphyrine sulfonate comme sensibilisateur, erreur $\pm 5\%$.

^b Dans CH₂Cl₂, erreur $\pm 5\%$

Tableau 5 : Constantes de vitesse ($k_r + k_q$) et valeurs de β déterminées par photolyse éclairée lors de la photooxygénation d'alcools allyliques.⁶⁵

Les facteurs affectant la formation des hydroperoxydes sont la température, le solvant, la quantité de sensibilisateur et l'intensité de la lumière.⁶⁶ Ces paramètres sont en partie responsables de la régio- et la stéréosélectivité des réactions entre l'oxygène singulet et les composés insaturés.⁶² L'oxydation par l'oxygène singulet dépend également du nombre de doubles liaisons ainsi que du type de doubles liaisons (conjuguées ou non). Ainsi, les constantes de vitesse de réactivité entre ¹O₂ et les acides oléique, linoléique et linoléique sont respectivement de 0,7 ; 1,3 et $1,9 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.⁴⁶

1.3.2. Oxydation des acides gras insaturés par voie photochimique

Les acides gras insaturés présents dans la nature peuvent être oxydés sous l'effet de la lumière et en présence d'un sensibilisateur tel que la chlorophylle par exemple.²⁶ L'oxygène singulet réagit avec le linoléate de méthyle avec une vitesse au moins 500 fois plus élevée que l'oxygène fondamental. ¹O₂ joue donc un rôle important.^{44, 67} Les conséquences biologiques de ces réactions sont multiples.

Avant tout, la figure 12 rappelle la structure moléculaire des acides gras mono-, di- et tri-insaturés ; les carbones attaqués par ¹O₂ sont représentés en bleu.

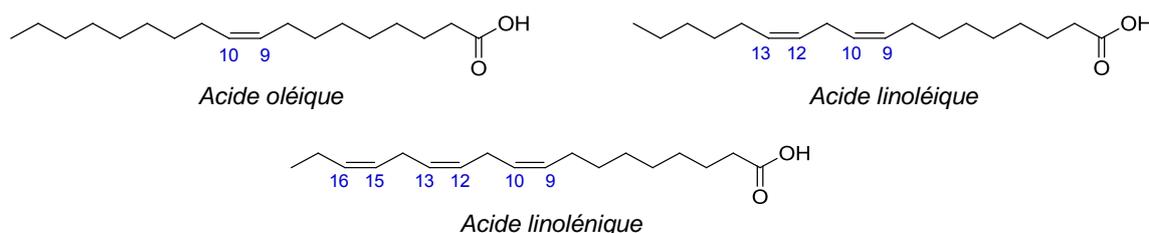


Figure 12 : Structure des acides oléique, linoléique et linoléique. Les numéros en bleu marquent la position des carbones porteurs du groupement -OOH lors de l'oxydation de l'acide gras par ¹O₂.

Dans le cas de doubles liaisons isolées, $^1\text{O}_2$ réagit avec chaque double liaison pour donner deux hydroperoxydes en quantité équivalente. Ainsi, les acides gras mono-insaturés produisent un mélange de deux isomères en position 9 et 10, avec une double liaison *trans*-allylique ; les di-insaturés forment un mélange d'hydroperoxydes sur C_9 et C_{13} (comme par autoxydation) ainsi que deux isomères en position 10 et 12 doublement insaturés (différents de l'autoxydation).²⁶

Les lipides tri-insaturés produisent un mélange complexe d'isomères en position $n = 9, 10, 12, 13, 15$ et 16, d'après une étude menée par Chan et al. sur le linoléate de méthyle.⁶⁸ Par ailleurs, les acides gras polyinsaturés présentent des doubles liaisons conjuguées conduisant à la formation d'endoperoxydes selon une cycloaddition [4+2]. Ainsi, le tableau 6 détaille et quantifie les différents produits obtenus par autoxydation et photooxydation du linoléate de méthyle, démontrant la diversité des produits d'oxydation d'un composé tri-insaturé.

Composés chimiques	Autoxydation	Photooxydation
	PV* (1286) (%)	PV* (1956) (%)
Ester non oxydé	74,8	65,5
Epoxy esters	0,3	1,6
Mono-hydroperoxyde	8,4	25,6
Peroxydes cycliques	7,7	2,2
Epoxy-hydroxy diène	0,1	-
Hydroperoxy-bicycloendoperoxides	-	0,1
Di hydroperoxydes	2,9	3,0
Hydroperoxy peroxydes bis-cycliques	-	1,0
Composés polaires non identifiés	5,9	1,0

* PV : indice de peroxydation (degré d'oxydation des acides gras insaturés - meq d' O_2 /kg d'huile)

Tableau 6 : Produits obtenus par autoxydation et photooxydation du linoléate de méthyle.²⁶

D'autre part, Neumann et al. en 1991 ont photooxydé des esters de méthyle d'acide gras en présence de rose Bengal et de tétraphénylporphyrine et quantifié par CG-SM les différents hydroperoxydes obtenus.⁶⁹ Les oléates forment les deux hydroperoxydes en proportions équivalentes tandis que les linoléates et les linoléates conduisent à des quantités d'hydroperoxydes différentes (tableau 7).

Acide gras	Hydroperoxydes isomères (%)					
	Autoxydation radicalaire					
Oléate	$\frac{8-OOH}{27}$	$\frac{9-OOH}{23}$	$\frac{10-OOH}{23}$	$\frac{11-OOH}{27}$		
Linoléate		$\frac{9-OOH}{50}$	$\frac{13-OOH}{50}$			
Linoléate	$\frac{9-OOH}{30}$	$\frac{12-OOH}{12}$	$\frac{13-OOH}{12}$	$\frac{16-OOH}{46}$		
	Photooxydation					
Oléate		$\frac{9-OOH}{50}$	$\frac{10-OOH}{50}$			
Linoléate	$\frac{9-OOH}{31}$	$\frac{10-OOH}{18}$	$\frac{12-OOH}{18}$	$\frac{13-OOH}{33}$		
Linoléate	$\frac{9-OOH}{21}$	$\frac{10-OOH}{13}$	$\frac{12-OOH}{13}$	$\frac{13-OOH}{14}$	$\frac{15-OOH}{13}$	$\frac{16-OOH}{25}$

Tableau 7 : Distribution comparée des isomères d'hydroperoxydes d'acides gras obtenus par autoxydation et photooxydation.²⁶ Les hydroperoxydes conjugués sont inscrits en bleu dans le tableau.²

Des produits secondaires d'oxydation sont également formés tels que les peroxydes cycliques (tableau 8). Le premier mécanisme avancé pour la formation des peroxydes cycliques implique une cyclisation [1,3]. Par exemple, dans le cas de l'acide linoléique, le schéma 9 détaille la cyclisation des isomères d'hydroperoxydes homo allyliques (12- + 13-OOH).

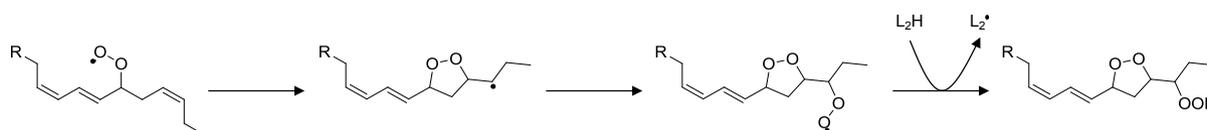


Schéma 9 : Formation d'un cycle à 5 chaînons à partir de l'hydroperoxyde 13-OOH de l'acide linoléique.²⁸

Des études ont confirmé ce mécanisme à partir du linoléate de méthyle autoxydé ainsi que des esters de méthyle photooxydés.⁷⁰ Ainsi une solution de monohydroperoxydes, obtenus par autoxydation, a été photooxydée puis analysée par CLHP,⁷⁰ affichant la composition décrite tableau 8. Cette étude montre que les cycles à 6 chaînons peuvent également être formés par une addition [1,4] de l'oxygène singulet sur le système diénique 1,3 des hydroperoxydes en positions 9 et 13 du linoléate de méthyle.

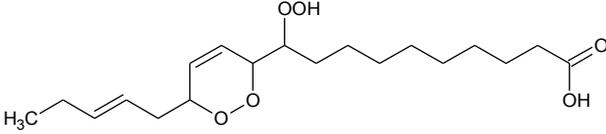
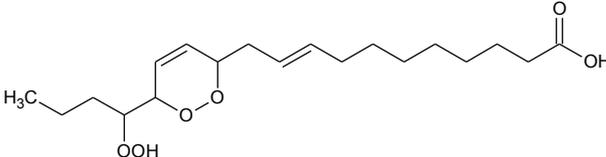
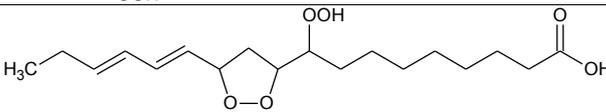
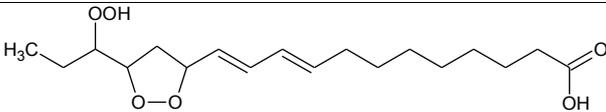
Structure du composé	Pourcentage massique estimé
Monohydroperoxydes non réactif	30 %
	12 %
	
	17 %
	26 %
Composés non identifiés	15 %

Tableau 8: Structure et quantification des hydroperoxy-epidioxydes de linoléate de méthyle formés par photooxydation d'un mélange de mono-hydroperoxydes obtenus par autoxydation. (Conditions : CH_2Cl_2 , bleu de méthylène comme sensibilisateur, O_2 , $0^\circ C$).^{70, 71}

La plus grande proportion des peroxydes présentant des cycles à 5 chaînons par rapport à ceux présentant des cycles à 6 chaînons indique que la cyclisation radicalaire des isomères des hydroperoxydes en position 12 et 13 prévaut sur la cycloaddition [1,4] de l'oxygène singulet sur les hydroperoxydes en position 9 et 16 du linoléate de méthyle. Ceci peut également être expliqué par le fait que les hydroperoxydes en C_9 et C_{16} subissent une isomérisation contrairement à ceux en C_{12} et C_{13} .⁷⁰

La température n'a qu'un faible effet sur l'oxydation par 1O_2 à cause de sa faible énergie d'activation (0 à 6 kcal.mol⁻¹).⁴⁰ La lumière est beaucoup plus importante dans les mécanismes d'oxydation par l'oxygène singulet. Cependant, Velasco et al. ont reporté que les effets de la lumière sur l'oxydation des huiles deviennent moindres lorsque la température augmente.⁷²

I.4. Dégradation des acides gras peroxydés

La décomposition des hydroperoxydes de lipides s'effectue selon des processus complexes et produit une multitude de composés pouvant avoir des effets biologiques néfastes ou modifier le goût et les parfums des aliments contenant des graisses et les huiles.³³ Cette décomposition est réalisée via la formation de radicaux qui engendrent une scission carbone-carbone formant des produits tels que des aldéhydes, des cétones, des hydrocarbures, des esters, des furanes ou des lactones.

I.4.1. Initiation des radicaux $LOO\cdot$ et $LO\cdot$

Les produits primaires de l'oxydation des acides gras insaturés, les hydroperoxydes notés LOOH, sont relativement stables. Néanmoins, en présence de métaux⁷³ ou à haute température, ils se décomposent facilement en radicaux alcoyles $LO\cdot$ et en radicaux peroxydes $LOO\cdot$ avant de former des aldéhydes, des cétones, des alcools, des acides, des esters et des hydrocarbures à chaînes courtes. La voie la plus probable de décomposition des hydroperoxydes est un clivage homolytique entre les deux atomes d'oxygène du groupement $-OOH$, entraînant la formation des radicaux alcoyles ($LO\cdot$) et des radicaux hydroxydes ($\cdot OH$). L'énergie d'activation de scission de cette liaison est de $46 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ et est donc plus faible que l'énergie nécessaire pour rompre la liaison O-H et former $LOO\cdot$.⁴⁰ Le radical alcoyle peut ensuite subir une β -scission homolytique de la liaison carbone-carbone (schéma 10).

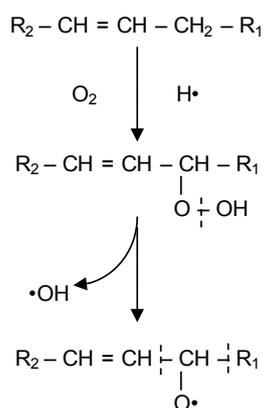


Schéma 10 : Mécanisme de décomposition des hydroperoxydes pour former les produits secondaires d'oxydation.⁴⁰

Un réarrangement électronique, l'addition d'un autre radical ou le transfert d'un hydrogène, permettent la formation de composés secondaires finaux de l'oxydation des lipides. Ce sont majoritairement des produits avec des masses moléculaires plus faibles et des fonctions aldéhydes, cétones, alcools. Cependant, le clivage des hydroperoxydes est amélioré par la présence d'oxygène mais cela favorise également la formation d'un polymère brun.

1.4.2. Propagation des radicaux LOO• et LO•

Les radicaux alcoyles et peroxydes sont responsables de la propagation radicalaire en chaîne. Parce que LO• ($k = 10^7-10^8 \text{ L M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^{28, 74} est plus réactif que LOO• ($k=62 \text{ L M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^{28, 75} il devient prépondérant dès que les hydroperoxydes se scindent. Il existe plusieurs mécanismes majeurs pour la propagation radicalaire. Le mécanisme dominant dans un système donné est largement déterminé par la structure des doubles liaisons, le solvant, les facteurs stériques, les conditions de réaction et particulièrement la température.

1.4.2.1. Transfert d'atome et arrachement d'un hydrogène

L'arrachement d'un hydrogène est l'étape initiale à l'origine des mécanismes radicalaires en chaîne classiques. L'arrachement d'un H par LO• est très rapide ($k \sim 10^7 - 10^8 \text{ L.M}^{-1}\text{s}^{-1}$) mais moins sélectif que LOO•.⁷⁴ Les radicaux initialement formés sur un site des acides gras transfèrent l'électron non apparié à la molécule de lipide adjacente par arrachement d'un hydrogène (équations 1.12 et 1.13). Le processus est répété indéfiniment jusqu'à ce que la chaîne soit interceptée.



Les facteurs influençant le taux d'arrachement d'hydrogène par les radicaux sont la disponibilité des H dans la molécule cible > la structure du radical > le solvant.⁷⁶

Curieusement, le principal effet de LO• est la génération de L'OO• (équation 1.13). L'énergie de dissociation de la liaison de l'hydrogène de l'hydroperoxyde est plus forte que celle d'un hydrogène allylique (90 contre 65-85 kcal.mol⁻¹), mais la liaison hydrogène entre le radical alcoyle et LOOH décroît considérablement l'énergie d'activation pour l'arrachement.⁷⁷ Le transfert d'hydrogène provenant de diène, par les radicaux peroxydes, est lent et hautement sélectif.⁷⁸ Deux facteurs gouvernent l'arrachement d'un hydrogène par LOO• : **1)** la disponibilité de l'hydrogène et **2)** la viscosité du milieu⁷⁹ puisque cette action est facilitée dans les milieux de faible viscosité.^{32, 80}

Le taux relatif d'arrachement par LO^\bullet est approximativement proportionnel au nombre d'hydrogènes allyliques ou doublement allyliques des acides gras comme nous pouvons le voir dans le tableau 9. Néanmoins, il semble que les hydrogènes en position bis allyliques soient préférentiellement arrachés par rapport aux autres.⁸¹

Acides gras	$k \times 10^{-6} \text{ L.mol}^{-1} . \text{s}^{-1}$	
	Solvant non polaire	Solution aqueuse
Oléique	3,8	68
Linoléique	8,3	130
Linoléinique	13	160
Arachidonique	20,5	180

Tableau 9 : Constantes de vitesse pour l'arrachement des hydrogènes de différents acides gras polyinsaturés par $t\text{-BuO}^\bullet$ dans différents solvants ; la réactivité de LO^\bullet étant comparable.²⁸

Quelque soit le radical, cette réaction est facilitée dans un solvant apolaire aprotique ou lorsque les lipides sont en forte concentration. Dans les solvants protiques⁸² ou à des concentrations en lipide modérées, l'arrachement des hydrogène, bien que rapide, peut se retrouver en compétition avec des réarrangements internes et des scissions.⁸³⁻⁸⁵ Lorsque d'autres sources d'hydrogènes sont présentes dans le milieu, un arrachement compétitif des hydrogènes en résulte, entraînant la réduction du radical et l'interruption de la propagation.⁸⁶ L'arrachement des hydrogènes augmente à température élevée quelque soit le solvant utilisé. Typiquement, la vitesse d'arrachement d'un H par un radical peroxyde est $\leq 1 \text{ L.M}^{-1} . \text{s}^{-1}$, mais elle augmente à $10^3\text{-}10^4 \text{ L.M}^{-1} . \text{s}^{-1}$ à 65°C .⁷⁸ Il est néanmoins difficile d'avoir des valeurs exactes puisque le taux de cyclisation de LOO^\bullet augmente plus que l'arrachement de H avec la température.

1.4.2.2. Fragmentation par α - et β - scissions

Il y a deux possibilités de scission des hydroperoxydes : les fragmentations α et β (schéma 11) selon la position du clivage de la chaîne par rapport au groupement hydroperoxyde. La fragmentation de la chaîne carbonée est réalisée par un état de transition qui médiate la transformation d'un radical alcoyle LO^\bullet non polaire à des produits de clivage polaires. Dans le cas des LOO^\bullet , une β -scission du radical peroxyde correspond à la rupture de la liaison C-O et la libération de O_2 , laissant alors un radical alkyle.

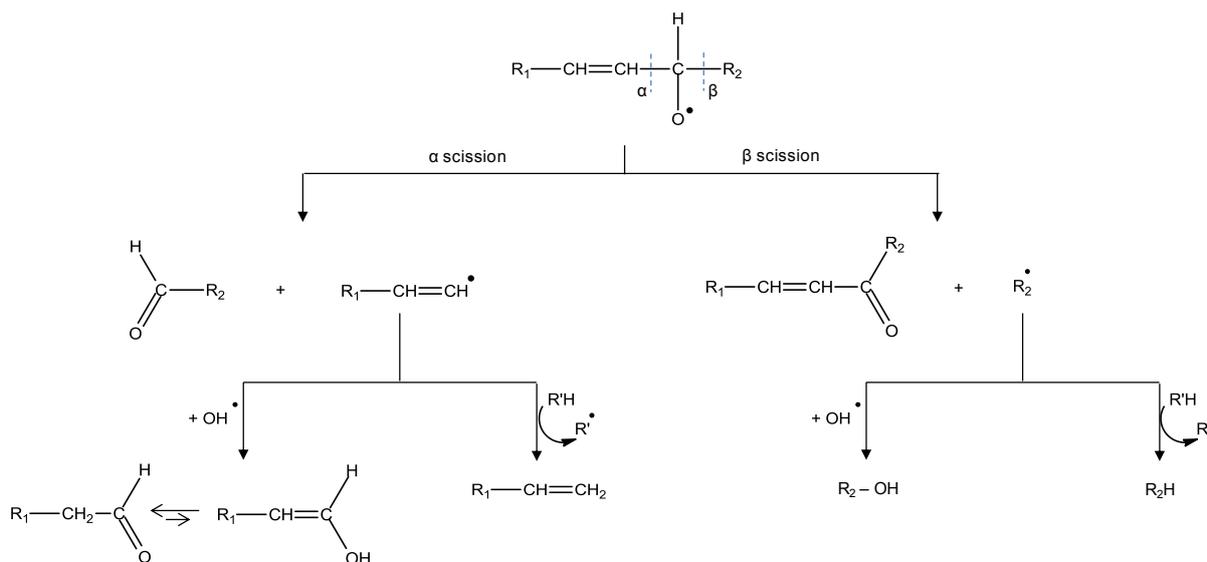


Schéma 11 : α et β scission des radicaux alcoyles LO^\bullet des acides gras.²⁶

Le mécanisme de scission est dépendant du solvant. En effet, il est rapide dans les solvants polaires. La constante de réaction dans une solution aqueuse est 10 à 100 fois plus élevée²⁸ que dans les solvants organiques non polaires où elle devient minoritaire.⁸⁷ L'eau et les solvants protiques stabilisent à la fois l'état de transition de plus en plus polaire et les produits carbonylés en permettant la solvatation ainsi que des liaisons hydrogènes pour réduire l'énergie d'activation de rupture de liaison.^{79, 83, 85, 88} La scission est également favorisée lorsque les lipides sont dilués dans une solution de solvants organiques non polaires, puisque cela réduit la compétition avec l'arrachement des hydrogènes.

Quelques soient les conditions, la propagation est accélérée en présence de doubles liaisons (augmentation de la polarité)⁷⁹ et à des températures élevées.²⁸ En effet, la chaleur accélère les scissions des radicaux quelque soit le solvant jusqu'à ce que celle-ci soit suffisamment élevée pour qu'une seconde scission ait lieu. Le clivages des hydroperoxydes est par exemple, sans importance à 60°C mais devient un facteur majeur de la propagation à $T > 100$ °C.⁸⁹

Dans le cas de l'acide linoléique, la vitesse de la β -scission de LOO^\bullet est compétitive avec l'arrachement d'un hydrogène en position allylique. Le déplacement de la distribution des isomères à température élevée modifie la distribution des produits finaux. Ainsi, lors du chauffage, les hydroperoxydes 13-OOH se transforment en leurs isomères le 9-OOH, et le mélange des produits finaux est proche de celui provenant des 9-OOH purs (tableau 10).

Produits	Point de scission	Rendement (%)			
		9-OOH	13-OOH	9-OOH pur	13-OOH pur
Hexanal	α 13-OOH	1,7	8,3	1	28
Octanoate de méthyle	α 9-OOH	5	4,3	37	27
2, 4-decadiène	α 9-OOH	20	12,5	51	33
Oxononanoate de méthyle	β 9-OOH	10,5	15,2	12	16

Tableau 10 : Rendement des produits de β -scission, obtenus par thermolyse, des isomères 13-OOH et 9-OOH de l'acide linoléique et leur correspondant après déplacement.⁹⁰

La détermination relative des scissions α et β de LOOH n'est pas encore complètement définie. Bien qu'il s'agisse d'une question de niveau énergétique (l'énergie de dissociation d'une liaison vinylique est de 109 kcal tandis que celle d'une liaison allylique est de 60 kcal).⁹¹ Une explication alternative résulte dans la préférence de formation des produits les plus stables tels que les aldéhydes saturés par exemple, au lieu d'aldéhydes insaturés.⁹²⁻⁹⁴ Les effets induits du groupement –OOH augmentent la tendance de scissions α . Ainsi la présence d'une fonction acide favorise un clivage sélectif entre –OOH et la double liaison. L'évaluation des produits provenant de l'oxydation des oléates par exemple montre une domination du clivage α augmentant lorsque la position du radical est éloignée de la fonction acide carboxylique. Par ailleurs, de nombreuses scissions, pourtant thermodynamiquement non favorables, se passent dans le même temps, générant un mélange complexe de produits. Par exemple, dans le cas des monohydroperoxydes, les clivages formant des produits saturés sont préférés ; pour les dihydroperoxydes, les α -scissions semblent majoritaires, même si l'on peut dénombrer 40% de β scissions dont la moitié sur le CH₃ terminal du radical.

La plupart des produits radicalaires dérivant des scissions se réarrangent en produits non radicalaires en arrachant un hydrogène dans le milieu, permettant la propagation de la réaction en chaîne. Les fragments insaturés, particulièrement ceux contenant des diènes conjugués, sont encore susceptibles à l'oxydation et leur réaction ultérieure contribue également au branchage en chaîne. La scission des radicaux conduit à l'obtention d'un mélange de produits carbonylés et de radicaux libres, typiquement des aldéhydes, des alcanes, des oxo esters.⁹¹ Les composés volatils produits, sont parfois associés au rancissement, et forment un mélange qui peut rapidement devenir complexe.

1.4.2.3. Réarrangement ou cyclisation

Le réarrangement interne ou cyclisation, le plus important pour LOO[•], procède par une addition [1,3] du radical peroxyde sur la double liaison voisine, s'attachant au carbone en position β pour former un exocycle à 5 chaînons et un radical sur le carbone γ de la double liaison (schéma 9 page 23).⁹⁵ La cyclisation intramoléculaire est 4 à 6 fois plus rapide que les β -scissions dans les acides gras hautement polyinsaturés. En effet, la formation d'un exocycle à 5 chaînons a une vitesse ($k \sim 10^3 \text{ s}^{-1}$)

plus élevée que la scission de la liaison O – O ($27\text{-}430\text{ s}^{-1}$) ou que l'arrachement d'un hydrogène ($1\text{-}400\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$);^{78, 96} ce processus est alors capable de rentrer en compétition particulièrement dans le cas des acides gras ayant 2 ou 3 doubles liaisons. Par exemple, en présence de doubles liaisons en position *cis* homoallylique d'un hydroperoxyde,^{97, 98} ce mécanisme peut avoir lieu sur les carbones C₁₃ et C₁₀ de l'acide linoléique.⁹⁹ La cyclisation de LOO' *via* une addition [1,4] sur le carbone γ de la double liaison voisine entraîne la formation d'un cycle à 6 chaînons, bien que cette réaction soit cinétiquement non favorable ($k \sim 10\text{ s}^{-1}$).^{32, 97} Il faut noter que chaque cyclisation forme un autre radical capable d'initier une nouvelle oxydation en chaîne.

La cyclisation de LO' implique une addition [1,2] sur une double liaison adjacente pour former un époxyde et des radicaux epoxyallyliques (schéma 12).

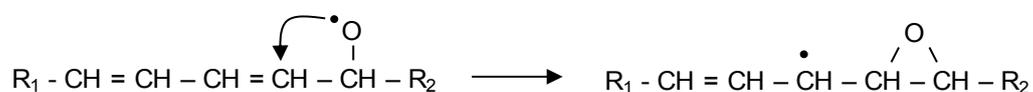


Schéma 12 : Formation d'un époxyde et d'un radical epoxyallylique par addition [1, 2].²⁸

Il s'agit d'une réaction très rapide qui devient dominante dans les solvants aprotiques, lorsque les lipides sont en faible concentration¹⁰⁰ ou hautement dispersés sur une surface, à température ambiante¹⁰¹⁻¹⁰³ et à faible pression d'oxygène.^{89, 100} La réaction s'accélère avec l'augmentation de la polarité du solvant.^{82, 84} Néanmoins, le radical LO' perd de sa stabilité dans les solvants polaires.^{82, 84}

La cyclisation des radicaux LO' est stéréospécifique. La configuration est fixée par la conformation du radical alcoyle de l'acide gras au point de cyclisation. De même qu'avec LOO', il y a une plus forte tendance pour LO' à former un cycle en position interne, probablement à cause de l'orientation de -O' relatif aux hydrogènes bis allyliques.¹⁰⁴

Le solvant, la concentration en lipide, les degrés d'oxydation et la température jouent un rôle dans le déplacement de la balance entre les arrachements d'hydrogène externe et les additions internes ou autrement dit entre la propagation en chaîne et la cyclisation. Les faibles pressions en oxygène, particulièrement, favorisent la cyclisation.¹⁰⁰ Dans les solvants aprotiques et dans les solutions diluées, à température ambiante, les arrachements externes des hydrogènes sont absents ou limités. La cyclisation domine à température ambiante mais l'accroissement de la température entraîne une augmentation de transferts d'hydrogène et de scissions, qui deviennent alors les effets directeurs de la propagation.⁸⁹ Ces mécanismes peuvent également être activés par les métaux tels que le fer ou le cuivre tandis que la compétition entre les deux mécanismes au sein des lipides génère un mélange de produits.^{95, 105}

1.4.2.4. Addition sur une double liaison (réticulation)

Lorsque l'arrachement des hydrogènes est limité, les radicaux ont une préférence pour s'additionner sur les molécules voisines.¹⁰⁶ L'addition de LOO^\bullet et LO^\bullet est alors rapide. Les facteurs contrôlant la réticulation sont la force de la liaison à former, l'encombrement stérique, les effets polaires et la stabilité du radical résultant.¹⁰⁷ Les doubles liaisons *trans* dans les lipides oxydés contrebalancent les effets stériques et améliorent les additions des radicaux peroxyes.¹⁰⁸ Le produit final dépend de la nature de la double liaison cible.

L'addition de LOO^\bullet augmente avec la température, le degré d'oxydation¹⁰⁹ et la polarité de solvant.¹⁰⁹
¹¹⁰ Les liens des dimères sont principalement C-O-O-C à faible température mais sont déplacés vers C-C et C-O-C lorsque la température augmente. Les radicaux peroxyes, en particulier, ont montré une forte tendance pour s'ajouter sur les doubles liaisons avec plus de 90% de dimérisation à 40°C. L'addition des LO^\bullet sur les doubles liaisons n'est pas aussi facile que celle des LOO^\bullet . Elle est favorisée par l'absence d'hydrogènes allyliques, par conjugaison et augmente avec la configuration *cis*. C'est pourquoi, LO^\bullet s'additionne plus sur les doubles liaisons *cis* que sur les *trans* (schéma 13).

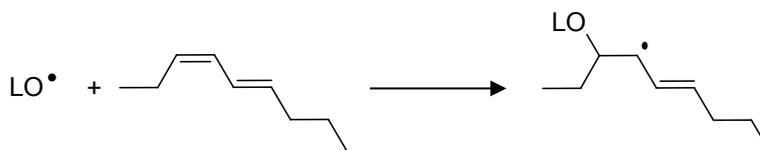
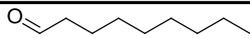
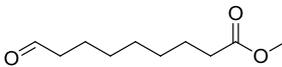
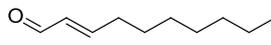
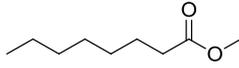
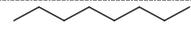
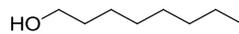
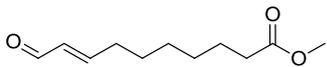
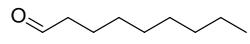
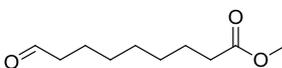
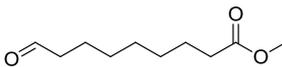
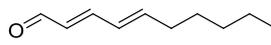
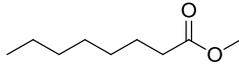


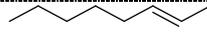
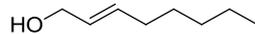
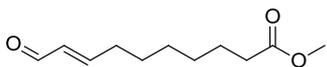
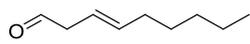
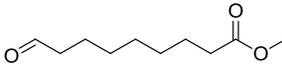
Schéma 13 : Addition de LO^\bullet sur une double liaison.²⁸

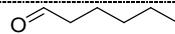
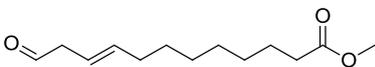
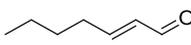
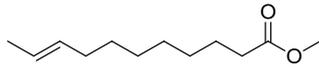
La propagation par l'addition des LO^\bullet est plus importante dans les solvants organiques. Bien qu'elle se produise dans les solvants aqueux, elle n'est généralement pas compétitive avec la scission et les réactions de réarrangements.

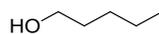
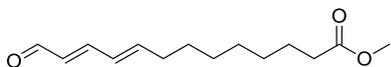
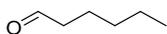
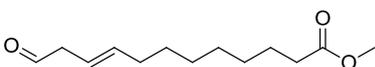
L'addition d'un radical sur une double liaison entraîne la formation d'un nouveau radical. La propagation en chaîne peut alors se poursuivre par trois voies différentes : **1)** l'élimination d'un radical alcoyle et formation d'un époxyde, ou l'addition de l'oxygène pour régénérer les radicaux peroxyes, **2)** l'addition d'un autre LOOH pour continuer la polymérisation - cette voie est favorisée par l'élévation de température¹¹¹ - ou **3)** l'arrachement d'un hydrogène pour propager la chaîne radicalaire et former un dimère d'hydroperoxydes stable.

ROOH	SCISSION	PRODUITS	STRUCTURES CHIMIQUES
ACIDE OLEIQUE C18 :1 Δ 9			
9-OOH (50 %)	α	nonanal	
		9-oxononanoate de méthyle	
	β	2-décenal	
		Octanoate de méthyle	

10-OOH (50 %)	α	octane	
		1-octanol	
	β	10-oxo-8-décénoate de méthyle	
		nonanal	
		9-oxononanoate de méthyle	
ACIDE LINOLEIQUE C18 :2 Δ 9, 12			
9-OOH (31 %)	α	3-nonénal	
		9-oxononanoate de méthyle	
	β	2,4-décadienal	
		octanoate de méthyle	

10-OOH (18 %)	α	2-octène	
		2-octèn-1-ol	
	β	10-oxo-8-décénoate de méthyle	
		3-nonénal	
		9-oxononanoate de méthyle	

12-OOH (18 %)	α	Hexanal	
		12-oxo-9-dodécénoate de méthyle	
	β	2-heptènal	
		9-undécénoate de méthyle	

13-OOH (33 %)	α	pentane	
		1-pentenol	
	β	13-oxo-9,11-tridéca-diénoate de méthyle	
		hexanal	
		12-oxo-9-dodécénoate de méthyle	

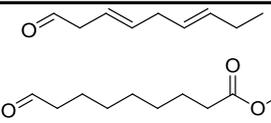
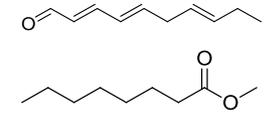
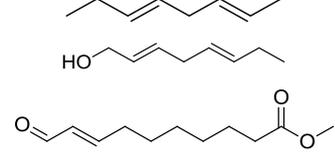
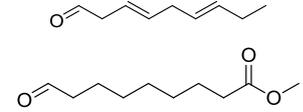
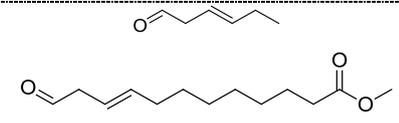
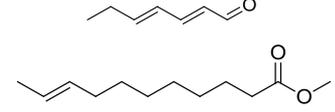
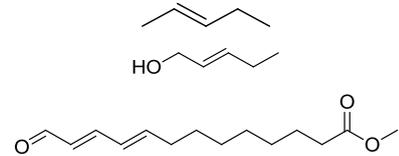
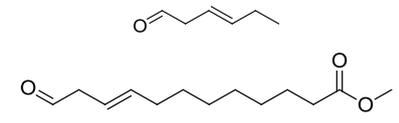
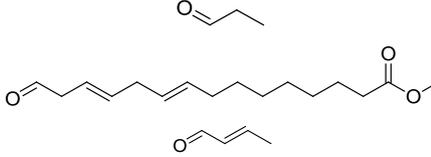
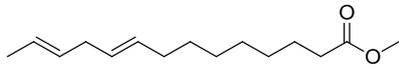
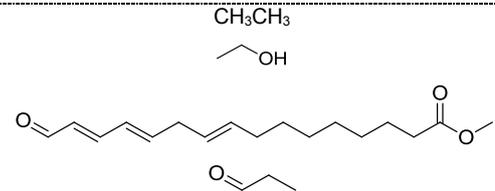
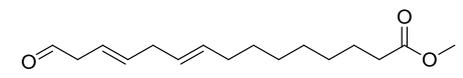
ACIDE LINOLENIQUE C18 :3 Δ 9, 12, 15			
9-OOH (21 %)	α	3,6-nonadiénal 9-oxononanoate de méthyle	
	β	2,4,7-decatriénal Octanoate de méthyle	
10-OOH (13 %)	α	2,5-octadiène 2,5-octadién-1-ol 10-oxo-8-décénoate de méthyle	
	β	3,6-nonadiénal 9-oxononanoate de méthyle	
12-OOH (13 %)	α	3-hexénal 12-oxo-9-dodécénoate de méthyle	
	β	2,4-heptadiénal 9-undécénoate de méthyle	
13-OOH (14 %)	α	2-pentène 2-pentén-1-ol 13-oxo-9,11-tridéca-diénoate de méthyle	
	β	3-hexénal 12-oxo-9-dodécénoate de méthyle	
15-OOH (13 %)	α	propional 15-oxo-9,12-pentadécadiénoate	
	β	2-buténal 9,12-butadécadiénoate de méthyle	
16-OOH (25 %)	α	éthane éthanol 16-oxo-9,12,14-hexadécatriénoate de méthyle propional	
	β	15-oxo-9,12-pentadécadiénoate de méthyle	

Tableau 11 : Produits de scission des hydroperoxydes des acides oléique, linoléique et linolénique, obtenus par photooxydation.^{26, 28, 33}

I.4.3.2. Produits issus de la thermolyse des produits secondaires d'oxydation

Comme indiqué dans la partie I.4.2.3., des composés cycliques, avec un ou plusieurs cycles à 5 ou 6 chaînons sont formés lors de l'oxydation secondaire des acides gras. Frankel, en 1984, étudia l'importance de ces produits oxydés pour déterminer leur rôle comme précurseurs de produits d'oxydation.¹¹⁴ Ainsi, il mit en avant que la thermolyse de peroxydes cycliques de linoléate produit beaucoup de composés volatils identiques à ceux émis par les mono-hydroperoxydes équivalents. Le clivage le plus important est celui entre le cycle et le groupement $-OOH$ et entraîne la formation d'aldéhydes et d'esters tandis que celui des cycles explique la formation d'aldéhydes ou d'esters insaturés (schéma 15). La scission de l'autre côté du groupement $-OOH$ produit des hydrocarbures et des esters à chaîne courte. Le schéma de fragmentation est identique pour les peroxydes bi-cycliques des linoléates.

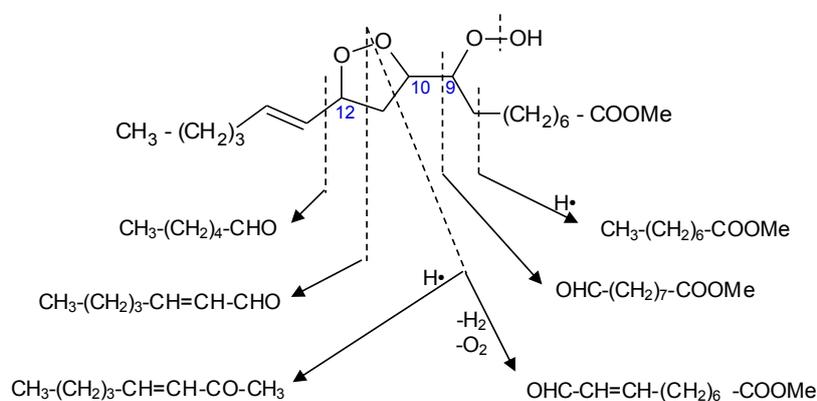


Schéma 15 : Exemple de décomposition thermique d'un produit secondaire d'oxydation cyclique du linoléate de méthyle.²⁶

1.5. Catalyse oxydative des acides gras insaturés

Les métaux présentant un potentiel redox sont probablement les initiateurs ayant la plus grande importance pour l'oxydation des lipides dans les huiles, les aliments et les systèmes biologiques. En effet, ils sont omniprésents et actifs sous de nombreuses formes. De plus, des quantités à l'état de trace sont suffisantes pour une catalyse efficace. Seuls les catalyseurs capables d'un transfert monoélectronique sont actifs à savoir : le cobalt, le fer, le cuivre, le manganèse et le vanadium. Les ions métalliques transférant deux électrons comme Sn^{2+} et Tl^{2+} ne sont pas actifs.¹¹⁵

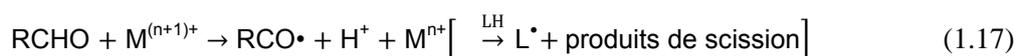
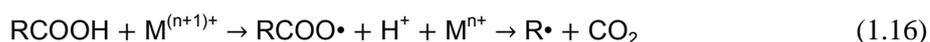
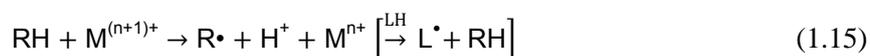
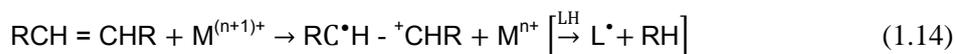
Les mécanismes et constantes d'initiation sont déterminés par un mélange de facteurs complexes :

- Le métal et le type de complexe qu'il forme
- Le chélatant ou l'agent complexant
- Le potentiel redox du métal et de ses complexes
- Le solvant
- La disponibilité en oxygène ou des hydroperoxydes formés.

1.5.1. Initiation directe

1.5.1.1. Via des métaux à haute valence

L'initiation directe via des métaux présentant un haut état de valence se déroule par un transfert d'électrons entre le métal et la liaison lipidique entraînant la formation de radicaux alkyles par arrachement d'un électron d'une double liaison (équation 1.14) ou de la liaison C-H de n'importe quel H labile de la molécule lipidique (équations 1.15-1.17).²⁸ Le fer et le cuivre sont connus pour suivre cette voie, de même que Mn^{116} , Cr^{117} et Co^{118} .



La réaction (1.16) a été démontrée avec le cobalt et les acides carboxyliques.^{119, 120} La réaction des aldéhydes (équation 1.17) est fortement catalysée par Cu^{2+} , Co^{3+} et Mn^{2+} ¹²¹⁻¹²³ et se produit principalement dans les solvants organiques ou les lipides. Néanmoins, elle est relativement lente et est non compétitive avec les trois premières réactions dans la plupart des conditions alimentaires.

Le transfert d'électron est exothermique (par exemple $\Delta H = -62,8 \text{ kJ}$, -15 kcal , dans le cas des linolénates de méthyle). C'est donc probablement le mécanisme dominant. Néanmoins, il faut noter que la réactivité du métal peut changer énormément avec les agents complexants (changement du potentiel redox) et avec le solvant (altération des propriétés acido-basiques). Les oxydations par transfert d'électrons pour générer L^\bullet sont extrêmement rapides dans les milieux non polaires,^{124, 125} incluant les huiles elles-mêmes et sont moins efficaces dans l'eau ou dans les solvants polaires protiques.

La constance et la sélectivité des transferts d'électrons directs des réactions (1.14) à (1.17) sont influencées par le type de complexe métallique formé. Dans des **complexes de sphère externe**, les électrons passent directement entre la couche de valence du métal et celle du groupe cible. Le transfert d'électrons est rapide et sélectif. Les **complexes de sphères internes** impliquent la liaison du ligand au métal permettant un flux d'électrons qui est lent et moins discriminant.¹²⁶ La distinction peut sembler académique, mais elle explique partiellement les différences de réactivité, de cinétique et de produits pour les différents métaux (tableau 12).

Métal	Type de complexe métallique formé	Milieu
Fe	Sphère externe	Polaire
Cu	Sphère interne	Non polaire
Co	Sphère interne	Non polaire ¹²⁷
	Sphère externe	Polaire ^{119, 128, 129}

Tableau 12 : Type de complexe métallique formé et milieu d'utilisation des différents ions métalliques dans le cas d'une initiation directe via des métaux présentant un haut état de valence.

1.5.1.2. Via des métaux à faible valence

Lorsque les métaux ont un état de valence faible, ils réagissent avec les hydroperoxydes alkyles pour augmenter leur vitesse de décomposition.¹³⁰ Ce processus d'initiation s'effectue à travers la formation de complexes activés avec O_2 ^{115, 131} (schéma 16) (via des complexes de sphère interne). Ces réactions sont favorisées dans les solvants non polaires.¹³²

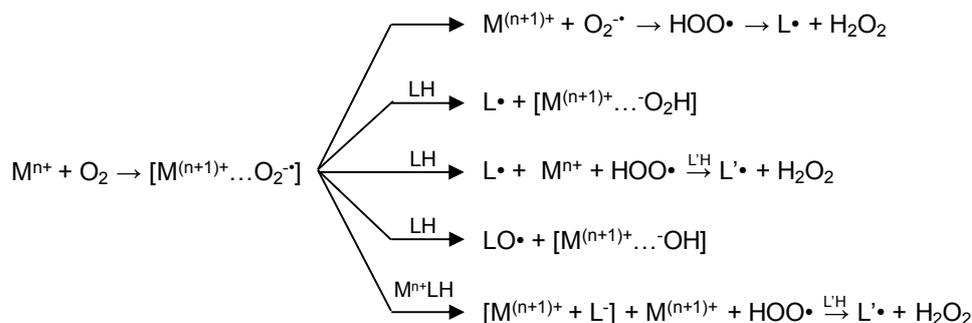
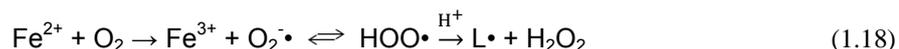


Schéma 16 : Initiation directe par les métaux à faible valence (M^{n+}) via l'autoxydation métallique produisant des espèces oxydantes réactives, $O_2^{\bullet-}/HO_2^\bullet$ et H_2O_2 .²¹

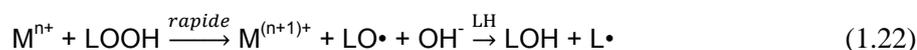
L'initiation directe est caractérisée par une absence de période d'induction¹³³ et est plus efficace par les métaux fortement oxydés (Co et Fe) et pouvant former des complexes métal-oxygène.

L'initiation indirecte de l'oxydation des lipides par les métaux réduits (Co²⁺, Fe²⁺, V²⁺, Cr²⁺, Cu²⁺, Ce³⁺, Mn²⁺) se produit selon deux mécanismes :

a) *Autoxydation des métaux réduits* pour générer des radicaux oxygénés qui réagissent ensuite avec les lipides¹³⁴ :



b) *Réduction ou oxydation des hydroperoxydes* en LO[•] ou LOO[•] (équations 1.18 et 1.21) qui vont ensuite réagir avec les lipides. Cette dégradation des hydroperoxydes augmente le taux de propagation de chaîne étant donné que les taux d'abstraction d'hydrogène par LO[•] et LOO[•] sont beaucoup plus rapides que les taux de formation des radicaux L[•]. Les métaux forment des complexes intermédiaires avec les hydroperoxydes¹³⁵ pendant l'oxydation et la réduction, particulièrement à faible concentration d'hydroperoxydes et dans des solvants non polaires.²⁸



Les effets inhibiteurs des métaux sont bien connus. L'inhibition est obtenue par oxydation et réduction des radicaux libres par le fer et le cuivre ou par complexation avec le métal dans le cas du cobalt. Il en résulte alors l'interruption du mécanisme en chaîne radicalaire et la réduction de la vitesse globale d'oxydation.²¹

Bien que les deux formes de valence des métaux aient une activité catalytique, les facteurs affectant les contributions relatives des différentes voies d'initiation ne sont pas bien connus. Ceci est particulièrement vrai pour les espèces oxygénées réactives qui peuvent être converties en HO[•] par la **réaction de Fenton** (équation 1.20) en présence de métaux de transition tels que Fe²⁺.¹³⁶

1.5.2. Initiation indirecte via des complexes hypervalents métal-oxygène

Les complexes d'ions ferryles¹³⁷ [Fe^{IV}=O ; FeO²⁺] et les ions perferryles [Fe^V] catalysent l'insertion de l'oxygène dans les liaisons C-H pour former des époxydes, des cétones, des alcools (tableau 13).

Cependant, les mécanismes pour la formation et la réaction des complexes Fe^{IV} sont encore incertains. Les complexes ferriques hypervalents sont considérés comme trop difficiles à former et trop instables pour être pertinents en solution.¹³⁸ Les ions ferryles hypervalents adopteraient des formes transitoires dans certaines solutions réactives et pourraient alors être l'espèce catalytique en cause plutôt que les radicaux hydroxyles. La participation de $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ peut expliquer les aspects des cinétiques et les distributions de produits qui sont incompatibles avec les mécanismes $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$.

$(\text{FeO})^{2+}$	$(\text{FeO})^{3+}$	$(\text{FeO}_4)^{2-}$
Fe^{IV}	Fe^{V}	Fe^{VI}
Ferryle	Perferryle	Ferrate
Complexes mélange métal-oxygène		
$\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2 - \text{Fe}^{3+}$		

Tableau 13 : Formules et nomenclatures des complexes ferriques hypervalents.²¹

Il est bien établi que les complexes métal-oxygène forment des intermédiaires hypervalents qui catalysent les réactions radicalaires et non radicalaires. Ainsi Fe^{IV} et Fe^{V} sont à la base des complexes de la réaction de Fenton.¹³⁹ A la fois Fe^{2+} et Fe^{3+} participent sous différentes voies : $\text{Fe}^{2+}-\text{HOOH}$ conduit à $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$; $\text{Fe}^{3+}-\text{HOOH}$ conduit au complexe $\text{Fe}^{3+}\cdot\text{OH}$ qui est fonctionnellement équivalent à Fe^{4+} .¹³⁹

$\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ arrache des hydrogènes plus rapidement que $\text{HO}\cdot$. Il peut arracher les hydrogènes allyliques des acides gras insaturés pour former des radicaux $\text{L}\cdot$ ou les hydrogènes des hydroperoxydes lipidiques pour former $\text{LOO}\cdot$, qui vont ensuite se propager selon un mécanisme en chaîne radicalaire.

Les facteurs et les conditions de la formation des ions ferryles qui paraissent les plus importants sont les suivants :

(1) *La structure du ligand*. Les ligands les plus électrophiles sont les plus efficaces pour produire Fe^{4+} .¹⁴⁰ Le changement de ligand peut altérer la durée de vie de $\text{Fe}^{\text{IV}} = \text{O}$ sachant que plus la durée de vie sera longue, plus la réactivité sera faible et inversement.

(2) *Le potentiel redox du complexe*,¹⁴⁰

(3) *L'arrangement spatial du ligand par rapport à l'atome de fer*,¹⁴¹⁻¹⁴³

(4) *Les propriétés acido-basiques du ligand*.¹⁴⁴ La présence d'une base de Lewis dans le ligand exerce un important effet pousoir sur le groupe $-\text{OH}$ de l'hydroperoxyde, améliorant à la fois la formation de $\text{Fe}^{\text{IV}} = \text{O}$ et l'homolyse de $\text{O}-\text{O}$ en $\text{Fe}^{3+} - \text{OOH}$,¹⁴⁴

(5) *Les proportions relatives de fer et d'hydroperoxydes*. Plus il y a de fer, plus l'insertion de l'oxygène sera favorisée ainsi que la formation des cétones.¹⁴⁰ Un excès d'hydroperoxydes entraîne une large quantité de radicaux libres et la réaction rapide du fer avec les hydroperoxydes au lieu des substrats.

(6) Le solvant et la présence d'eau. 1-5% d'eau diminue le potentiel redox des complexes ferriques et augmente la scission homolytique en radicaux HO[•] ; dans les solvants aprotiques les scissions hétérolytiques et les produits d'insertion de l'oxygène prédominent.

(7) La structure chimique des hydroperoxydes formant le complexe initial. Cela altère la structure et l'état de spin du complexe Fe⁴⁺.^{140, 145}

I.6. La voie enzymatique

I.6.1. Présentation, mode d'action et mécanisme des enzymes

I.6.1.1. Présentation des enzymes

Les enzymes sont des protéines capables de catalyser une réaction sur une petite quantité de produit sans subir elle-même de modifications.¹² Elles présentent une grande sélectivité et sont capables d'agir sur un seul composé présent dans un mélange complexe. Elles sont considérées comme « vertes » et trouvent de plus en plus leur place dans l'industrie de synthèse de chimie verte. Leur classification, basée sur les réactions qu'elles catalysent, repose sur 6 grandes catégories¹² :

<i>Les oxydoréductases</i>	Ces enzymes catalysent les réactions d'oxydoréduction. Cette classe inclue les oxydases qui permettent une oxydation directe avec l'oxygène moléculaire et les déhydroxygénases qui catalysent le retrait d'un hydrogène d'un substrat pour le passer à un autre substrat.
<i>Les transférases</i>	Les transférases catalysent le transfert d'un groupe fonctionnel d'un composé donneur à un autre composé accepteur.
<i>Les hydrolases</i>	Ces enzymes catalysent les clivages hydrolytiques de C-O, C-N, C-C et certaines autres liaisons (exemple : les protéases ou les estérases).
<i>Les lyases</i>	Il existe deux types de lyases : un groupe catalyse l'addition sur une double liaison tandis que l'autre catalyse le retrait de groupes. Les deux espèces d'enzymes, que ce soit pour l'addition ou l'élimination de petites molécules, agissent sur les carbones hybridés sp ³ .
<i>Les isomérases</i>	Comme son nom l'indique cette famille d'enzymes catalyse différents types d'isomérisations tels que les racémases, les épimérasés ou les tautomérasés.

Les ligases

Les ligases agissent sur la catalyse de la formation ou du clivage des carbonnes hybridés sp^3 .

Ainsi, les enzymes peuvent être utilisées à plusieurs niveaux dans l'oxydation des lipides. Certaines sont capables d'oxyder les acides gras en hydroperoxydes alors que d'autres sont utilisées pour leur dégradation. Dans l'huile d'olive par exemple, l'acyle hydrolase, la lipoxygénase, l'hydroperoxyde lyase, l'alcool déshydrogénase ou encore l'alcool acétyle transférase sont à l'origine de l'oxydation des acides gras contenus dans l'huile, à l'origine de son odeur et de sa saveur.¹¹²

1.6.1.2. Mode d'action des enzymes

Les enzymes sont des protéines et sont synthétisées par des cellules vivantes. Elles agissent comme catalyseurs dans de nombreuses réactions biochimiques qui ont lieu naturellement. On peut citer par exemple, la dissociation de H_2CO_3 en CO_2 et H_2O dans les poumons grâce à l'anhydrase carbonique.

De même que les catalyseurs chimiques, les enzymes ne sont pas altérées durant leur réaction, restent inchangées et sont utilisées en petites quantités. Leur principale caractéristique est leur spécificité d'action :

- Les enzymes sont **réactives spécifiques** : elles ne catalysent qu'un seul type de réaction
- Les enzymes sont **substrats spécifiques**
- Un grand nombre d'enzymes sont également **cinétiquement spécifiques**.
- Enfin, elles sont, pour la majorité, **stéréospécifiques**.

Néanmoins, leur action peut être influencée par un certain nombre de facteurs : **1)** La concentration en ions H^+ puisque l'activité des enzymes dépend du pH et se trouve être la plus efficace dans une gamme de pH comprise entre 5 et 9 ; **2)** La température : celle optimale est entre 40 et 50°C ; **3)** La concentration d'enzyme et de substrat.

1.6.1.3. Mécanisme des enzymes

Ahluwalia décrit les étapes de catalyse des enzymes de la manière suivante :

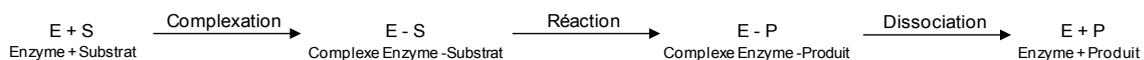


Schéma 17 : Mécanisme d'action des enzymes sur les substrats.¹²

Durant la première étape, la molécule du substrat (S) se fixe à certains points spécifiques de l'enzyme (E) pour donner un complexe enzyme-substrat (ES). Durant cette fixation de l'enzyme avec le substrat des liaisons hydrogènes, des forces électrostatiques, des liaisons hydrophobiques ou des liaisons chimiques peuvent être mises en jeu. Le point d'attache spécifique de l'enzyme est appelé site actif sachant qu'une enzyme peut avoir un ou plusieurs sites actifs. Les étapes suivantes concernent la conversion du substrat en produit (EP), le produit restant fixé à l'enzyme. Pour finir, (EP) est séparé et le produit P est libéré tandis que l'enzyme (E) est à nouveau disponible pour d'autres réactions.

Le rôle principal d'une enzyme est de diminuer l'énergie d'activation des réactions qu'elle catalyse bien que le mécanisme par lequel l'enzyme abaisse cette énergie ne soit pas encore connu. La haute efficacité des réactions catalysées par les enzymes est attribuée aux facteurs suivants :

- L'augmentation de la concentration des substrats
- La facilité de formation des états de transition
- L'abaissement de l'énergie d'activation

En 1890, Emil Fisher a proposé le modèle *clé-serrure* pour expliquer la spécificité de l'action enzymatique. Selon Fisher, la géométrie de l'enzyme (la serrure) est complémentaire au substrat (la clé). La réaction nécessite une interaction entre un ou plusieurs groupes avec des motifs de la cavité enzymatique comme une clé dans une serrure. La rigidité de cette théorie ainsi que la possibilité des enzymes à réagir avec différents substrats montrent les limites de ce modèle. Cependant, il a été maintenant compris que les enzymes sont dynamiques. Ainsi l'interaction enzyme-substrat comme la clé dans la serrure est permise après l'ajustement de l'enzyme au substrat dès l'entrée partielle de celui-ci vers les sites actifs. Il s'agit du modèle de la *forme induite* développé par Daniel E. Koshland en 1958.

Les acides gras insaturés sont très présents dans la nature. Leur oxydation par voie enzymatique est naturellement réalisée à très grande échelle en grande partie par la lipoxigénase dans un premier temps. L'action de cette enzyme entraîne la formation d'hydroperoxydes. Leur dégradation est permise par l'hydroperoxyde lyase, permettant le clivage des hydroperoxydes d'acides gras insaturés en aldéhydes, cétones ou autres composés volatils. Ce sont ces mécanismes de dégradation enzymatiques qui sont à l'origine des odeurs des plantes. Il s'agit de la voie de la lipoxigénase (schéma 18) utilisée pour convertir les lipides (acide linoléique et linoléique) en molécules volatiles à courte chaîne à haute valeur ajoutée.¹⁴⁶ Cette technique a permis de contribuer à la valorisation des huiles végétales de manière plus rapide et plus sélective.^{33, 147-150}

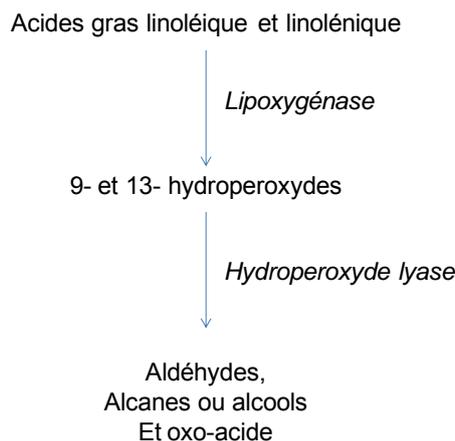


Schéma 18 : Voie enzymatique simplifiée d'oxydation et de dégradation des hydroperoxydes des acides gras insaturés linoléique et linoléinique.¹⁶

1.6.2. La lipoxygénase (LPO)

André et al.¹⁵¹ ont décrit en 1932 la présence d'un mécanisme chez les végétaux catalysant l'oxydation des lipides par l'oxygène de l'air. Cette réaction catalytique se produit lorsque le tissu subit une blessure ou une agression, ou encore suite à un stress chimique ou mécanique. Il a été montré par exemple, l'apparition de cette enzyme à la surface de la peau lors d'une inflammation de celle-ci ou après une longue exposition au soleil.¹⁵² La lipoxygénase a pour rôle de transformer les acides gras polyinsaturés tels que l'acide linoléique et l'acide linoléinique en 9(S)- ou 13(S)-hydroperoxyde de l'acide gras correspondant. L'étape suivante est le clivage des hydroperoxydes par l'hydroperoxyde-lyase en aldéhydes et en oxo-acides.¹⁵³ L'alcool-déshydrogénase peut être utilisé pour réduire ensuite les aldéhydes en alcools.

Les protéines du type lipoxygénase ont une simple chaîne de polypeptide avec une masse moléculaire de 75-80 kDa chez les animaux et 94-104 kDa chez les plantes. Les enzymes ont un domaine terminal en forme de tonneau et un large domaine catalytique contenant un simple atome de fer non-héminique.¹⁵⁴ Comme le fer est non-héminique, la lipoxygénase apparaît incolore à l'œil nu. Lorsqu'elle est isolée, l'enzyme est souvent sous forme ferreux et donc inactive. Son oxydation est requise pour la catalyse (schéma 19).¹⁵⁵ La LPO est dépendante du pH et de la température. Par exemple, les réactions réalisées à des températures inférieures à 10°C conduisent à des réactions spécifiques amenant à plus de 90% d'isomères 13-hydroperoxydes d'acides gras.¹⁴⁶

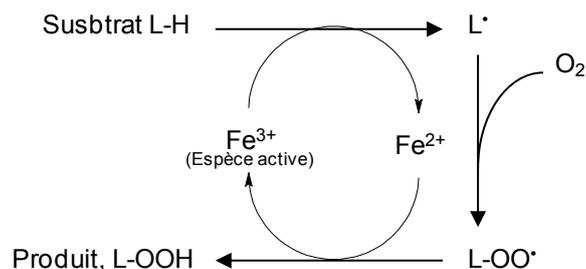


Schéma 19 : Catalyse par la lipoxigénase et formation des hydroperoxydes d'acide gras par une réaction en cage.¹⁵⁵

La nomenclature de la lipoxigénase est basée sur sa spécificité d'action. Pour cela le chiffre correspondant au numéro du carbone sur lequel agira l'enzyme est ajouté devant LOX. Ainsi la 13-LOX est un enzyme qui catalysera la formation de l'hydroperoxyde sur le carbone 13 en partant de la fonction acide. Lorsqu'il est nécessaire, la stéréoconfiguration *R* ou *S* est spécifiée (exemple : 13*R*-LOX ou 13*S*-LOX).¹⁵⁵

Les lipoxigénases catalysent l'oxydation aérobie des acides gras ayant des doubles liaisons *cis* non conjuguées pour générer des LOOH conjugués sans pour autant avoir libéré de radicaux libres (schéma 20). Les hydroperoxydes sont synthétisés par une réaction en cage impliquant un transfert d'électrons vers le lipide à partir des ions ferriques du site actif de l'enzyme,¹⁵⁶ entraînant l'arrachement de l'hydrogène bis allylique comme étape déterminante.^{157, 158} L'oxygène lié à un site de l'enzyme est activé pour réagir avec le radical libre, puis un ion H^+ est cédé à partir de l'enzyme pour compléter LOOH avant de le libérer. Etant donné que l'oxygène est toujours additionné en position anti de l'hydrogène extrait, les diènes conjugués résultant sont toujours en position *trans*, *cis*- par rapport à l'hydroperoxyde.¹⁵⁷

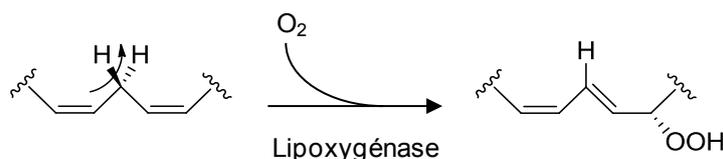


Schéma 20 : Formation des hydroperoxydes d'acide gras par la lipoxigénase.¹⁵⁵

Kermasha et al. ont montré que lorsque celle-ci est immobilisée, l'enzyme est beaucoup plus stable que lorsqu'elle est libre.¹⁵⁹ En effet, dans ce cas, l'activité maximale est obtenue à 70 °C et conserve la moitié de sa réactivité enzymatique à 100°C alors que l'enzyme libre ne présente plus aucune activité à 90°C. Son pH optimal d'utilisation est entre 6,6 et 7,0.¹⁶⁰ Le principal avantage de cette enzyme est de pouvoir transformer un substrat hydrophobe en produit hydrophile.¹⁵⁴

En 1992, G.J. Piazza¹⁶¹ a étudié la conversion de l'acide linoléique en hydroperoxydes, à température ambiante dans une microémulsion, utilisant l'air comme source d'oxygène et la lipoxygénase comme catalyseur. Cette étude a mis en avant que la lipoxygénase est plus active dans un milieu polaire et que la présence de tensioactif peut entraîner une accélération de la réaction car cela augmente la quantité d'oxygène solubilisée dans le milieu.

Les LOOH produits par la lipoxygénase elle-même peuvent atteindre des pourcentages élevés sous des conditions appropriées (froid et noir par exemple), amenant ensuite à des réactions en cascade et à une oxydation rapide suite à la décomposition des LOOH.¹⁵² La réaction radicalaire en chaîne de l'oxydation est initiée lorsque LOOH est décomposé en LO[•] et [•]OH par la lumière ou la chaleur, en LO[•]/LOO[•] par les métaux ou en LO[•] par l'enzyme elle-même.¹⁶²

1.6.3.L'hydroperoxyde-lyase

1.6.3.1. Présentation et mécanisme d'action de l'hydroperoxyde-lyase (HPO-lyase)

L'hydroperoxyde-lyase (HPO-lyase) a été isolée pour la première fois des pépins de pastèque en 1976.¹⁶³ Il s'agit d'une enzyme membranaire de masse moléculaire entre 170 et 200 kDa. Cette enzyme est de nature hydrophobe et présente un pH optimal proche de la neutralité, se situant entre 5,5 et 8.¹⁵⁴ Dans tous les cas, les auteurs ont pu mettre en avant que son activité enzymatique est 10 fois plus importante pour les hydroperoxydes triénoïques que pour les diénoïques.¹⁶⁴ De plus, celle-ci a tendance à augmenter avec le nombre de carbones jusqu'à 22 C ; ensuite elle diminue à nouveau. Cette enzyme présente donc une préférence marquée pour l'acide linoléique plutôt que pour l'acide linolénique.¹⁶⁵ Il s'agit d'une enzyme de stress, libérée lorsque la plante se trouve en présence d'organismes pathogènes ou de métaux. Le clonage des enzymes issues des poivrons verts a révélé que l'HPO-lyase appartient à la famille des cytochromes P-450.^{166, 167} Elle en constitue une nouvelle sous-famille baptisée CYP74B. On peut la retrouver dans des organes divers tels que les feuilles, les fruits, les racines et même les graines.

Il y a deux types d'hydroperoxydes lyases classés en fonction de leur type de clivage. Les hydroperoxydes lyases homolytiques clivent la liaison entre le C portant la fonction –OOH et le carbone saturé. Les hydroperoxydes lyases hétérolytiques agissent sur la liaison entre le carbone porteur de la fonction hydroperoxyde et la double liaison (schéma 21).

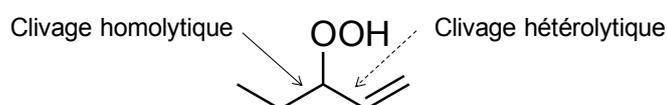


Schéma 21 : Les clivages homolytique et hétérolytique des hydroperoxydes d'acides gras catalysés par l'hydroperoxyde lyase.¹⁶⁸

La dégradation des composés peroxydés par voie catalytique donne des aldéhydes et des ω -oxo-acides en fonction du composé de départ.¹⁶⁴ Bien qu'aucun mécanisme précis de clivage des hydroperoxydes ne soit connu, Matsui, en 1998, a évoqué la possibilité que le cœur du site actif soit situé dans un « couloir hydrophobe » ce qui empêche les autres hydroperoxydes de réagir, donnant la spécificité aux 13- ou 9-hydroperoxydes d'acides gras. Une fois complexé avec le site actif, une compétition entre un mécanisme radicalaire et un mécanisme ionique existerait, tous les deux accélérés par le noyau hème. Alors que le mécanisme ionique engendrerait la libération d'aldéhydes et des oxo-acides, le mécanisme radicalaire entraînerait la dégradation de l'enzyme. Malheureusement, bien que le mécanisme de dégradation des hydroperoxydes soit plus rapide, il est toujours accompagné du second qui se trouve être irréversible pour l'HPO-lyase.

1.6.3.2. Dégradation homolytique des hydroperoxydes par HPO-lyase

Le clivage homolytique des hydroperoxydes par l'hydroperoxyde-lyase a été démontré par un certain nombre d'études. Ainsi, « l'alcool des champignons », le 1-octèn-3-ol, proviendrait d'un clivage homolytique par l'HPO-lyase spécifique au 10-hydroperoxyde de l'acide linoléique¹⁶⁹, donnant également un autre fragment l'acide 10-oxo-8(E)-décénoïque. Le soja constitue également un autre exemple de clivage homolytique des hydroperoxydes par cette enzyme. La présence du 2-pentèn-1-ol et de l'acide 13-oxo-tridéca-9(Z),11(E)-diénoïque valide ce mécanisme.¹⁶⁸ Néanmoins, certains auteurs tels que Salch et al.¹⁷⁰ (1995) prétendent que la lipoxygénase pourrait être également à l'origine du clivage des hydroperoxydes dans la voie de la lipoxygénase, démontrant que cette activité secondaire de l'enzyme de formation des hydroperoxydes est 24 fois plus importante en conditions anaérobies. Le clivage homolytique des hydroperoxydes d'acides gras n'est donc pas uniquement dû aux HPO-lyases, mais également à l'activité secondaire d'autres enzymes du milieu telles que les lipoxygénases.¹⁷¹ Par exemple, l'étude de la libération des aldéhydes C₆ des feuilles de soja en fonction de leur âge par Zhuang en 1992 suggère que la dégradation des hydroperoxydes et la formation des aldéhydes est plus limitée par la quantité de LPO présente dans le milieu que de HPO-lyase.

1.6.3.3. Clivage hétérolytique par l'hydroperoxyde lyase

L'hydroperoxyde lyase à l'origine du clivage hétérolytique est très répandue dans le domaine des végétaux. En effet, la production d'aldéhydes volatils issus des plantes a été pour la première fois reportée il y a plus de 45 ans.¹⁷² Il existe trois catégories d'enzymes en fonction de leur activité :

- Une hydroperoxyde lyase qui catalyse le clivage des 9-hydroperoxy d'acides gras pour donner un C₉-oxo-acide et un C₉-aldéhyde. On retrouve notamment cette spécificité dans les poires.^{16, 153, 173}
- Les 13-hydroperoxyde lyases (13-HPO-lyase) catalysant le clivage des 13-hydroperoxy d'acide gras pour donner un C₁₂-oxo acide et un C₆-aldéhyde. Cette activité particulière été mise en évidence dans les tomates^{174, 175} ou les graines de soja¹⁷⁶ par exemple.
- Les lyases capables d'agir sur les 9-hydroperoxydes et les 13-hydroperoxydes d'acide gras.¹⁶⁸ On les retrouve notamment dans le concombre.

Le mécanisme actuellement accepté de la catalyse des hydroperoxyde-lyases inclue de nombreux intermédiaires comme le montre le schéma 22. Un radical époxyde (**1**) ou un cation (**2**), produits par le clivage d'une liaison O-O de l'hydroperoxyde, subit un réarrangement pour donner un cation d'éther vinylique (**3**), qui, attaqué par une molécule d'eau va donner un hémiacétale vinylique ou son équivalent (**4**). Enfin, le réarrangement de l'intermédiaire (**4**) va former deux fragments d'aldéhyde.¹⁶⁶ Ce mécanisme a pu être mis en avant grâce à l'utilisation d'isotope ¹⁸O expérimentalement.

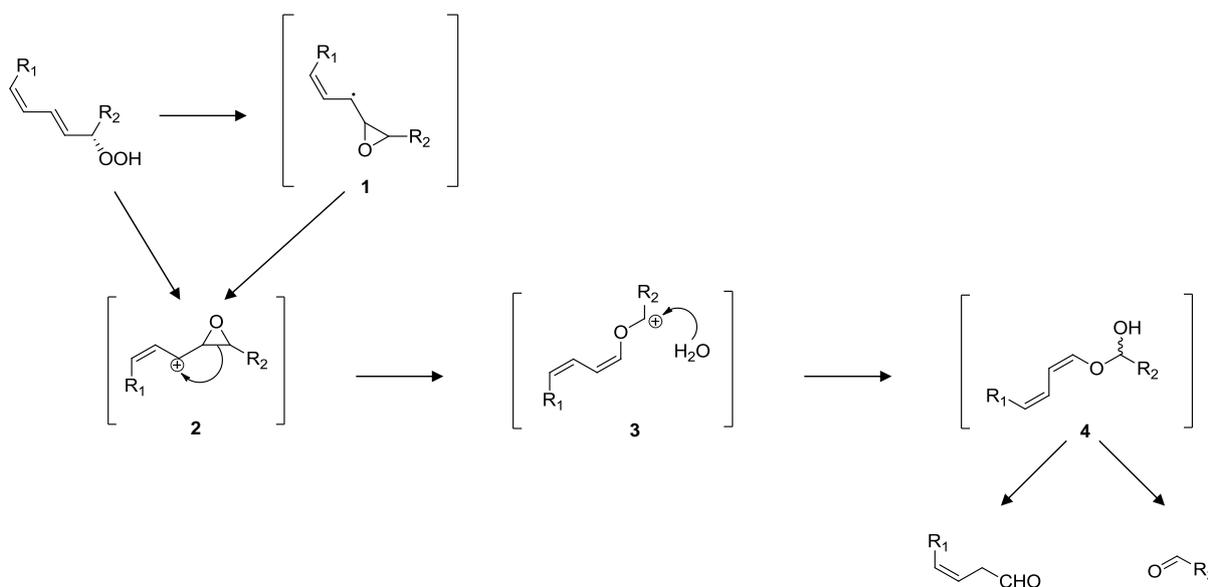


Schéma 22 : Mécanisme catalytique de l'hydroperoxyde-lyase.¹⁶⁶

Dans les tomates, les 13-hydroperoxydes d'acide linoléique (13-HPOD) et d'acide linoléique (α -13-HPOT) sont présents. L'enzyme purifiée montre une cinétique d'action sur l' α -13-HPOT 8 fois supérieure à celle sur le 13-HPOD. Cette observation a été validée par l'absence de nonenal et de ces produits dérivés dans les volatils composants l'huile d'olive vierge.¹⁶⁵ Le composé majeur de cette dégradation enzymatique correspond au 3Z-hexenal, tandis qu'un composé minoritaire a été identifié comme étant le 2E-hexenal. Par la suite, seul le 3Z-hexenol a été identifié démontrant bien que l'HPO-lyase des tomates convertit les 13-hydroperoxydes des acides linoléique et linoléique en 3Z-hexenal et en acide 12-oxo-9Z-dodécénoïque. Les faibles quantités des isomères Z/E de ces deux composés majeurs proviennent donc d'un réarrangement et ne peuvent pas être appropriées à une activité

enzymatique. Rehbock et al. ont mis en évidence un haut taux de conversion molaire des hydroperoxydes 13-HPOT en 2E-hexenal dans le cas de l'étude des graines de haricots mungo.¹⁷⁷ La décomposition des 13-hydroperoxydes d'acide linoléique par cette voie donnerait l'hexanal et l'acide 12-oxo-(9Z)-dodécénoïque.¹⁷⁸

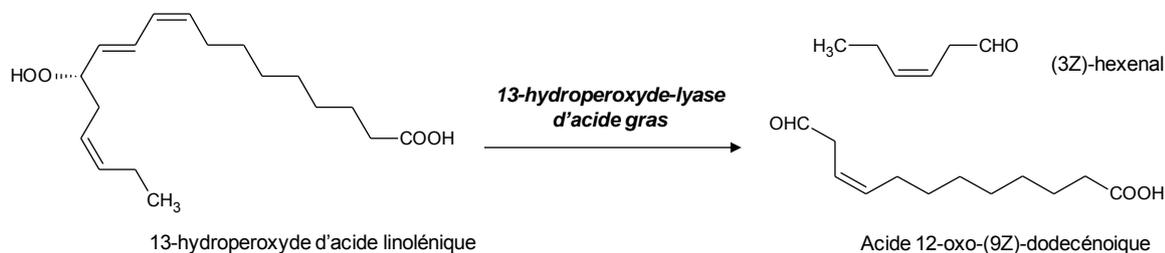


Schéma 23 : Décomposition du 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique par la 13-HPO-lyase.¹⁷⁹

Cette enzyme est très répandue dans le règne végétal. Ainsi on la retrouve dans 28 différentes feuilles de plantes (la banane, les épinards, le thé). Les composés volatils formés par le clivage des hydroperoxydes sous l'action de l'enzyme génèrent différentes odeurs en fonction de leur structure chimique que nous avons reportées tableau 14. Les différences de proportions de chaque aldéhyde et de leurs alcools¹⁶ correspondants, produits par l'alcool déshydrogénase, donnent cette « odeur verte » caractéristique des espèces végétales.^{165, 180, 181} Par exemple, l'hexanal et le 3Z-hexenal sont des composés odorants les plus abondants dans l'arome d'huile d'olive.¹⁶⁵ Néanmoins, la composition d'une fragrance reste complexe. Ainsi, les volatils issus de l'huile d'olive sont composés d'aldéhydes et d'alcools mais également d'esters, de cétones et d'acides carboxyliques.¹¹²

L'ensemble des molécules issues de la dégradation des hydroperoxydes d'acides gras par cette enzyme présente d'autres intérêts que des propriétés olfactives. Ainsi, l'acide 12-oxo-10(E)-dodécénoïque est précurseur d'une hormone de croissance¹⁶⁴ tandis que les aldéhydes sont des antifongiques doublés de composés aromatiques ayant une note verte très recherchée dans l'industrie.¹⁴⁶ De plus, le 2E-hexenal présente des propriétés bactéricides¹⁵⁰ et insecticides.¹⁶²

Substrats		Composés de dégradation oxydante et leurs odeurs	
Acides gras	Position de l'oxydation	Aldéhydes	Alcools
Acide linoléique	C ₁₃	hexanal	hexan-1-ol
		odeur grasse, verte fruitée	verte huileuse
Acide α-linolénique	C ₁₃	3Z-hexénal	3Z-hexèn-1-ol
		(verdure, olive verte)	verte herbeuse, fraîche
		2E-hexénal	2E-hexénol
Acide linoléique	C ₉	feuille verte, fruitée	vert tranchant, fruitée
		3Z-nonénal	3Z-nonénol
		concombre	(sans odeur)
		2E-nonénal	2E-nonénol
Acide α-linolénique	C ₉	citrus, gras	melon, cireux
		3Z, 6Z-nonadiénal	3Z, 6Z-nonadiénol
		melon, concombre, poivrée	pastèque
		2E, 6Z-nonadiénal	2E, 6Z-nonadiénol
		légume vert, concombre	vert herbacé, concombre amer

Tableau 14 : Produits d'oxydation des acides gras par la voie de la lipoxygénase.¹⁵⁴

1.6.3.4. Inhibition de l'hydroperoxyde-lyase

Les hydroperoxydes, substrats de l'HPO-lyase, en sont également un poison. En effet, il a été observé que lorsque l'enzyme catalyse leur dégradation, celle-ci s'en retrouve inactive en fin de réaction. Le groupement –OOH est une condition nécessaire mais non pas suffisante pour expliquer cette inhibition de l'enzyme : les hydroperoxydes de cumène par exemple ne désactivent pas l'HPO-lyase. D'autres études ont montré que les hydroperoxydes, reconnus spécifiquement par l'enzyme sont transformés en espèces radicales hydrophobes, entraînant la destruction du groupe –SH et donc l'inhibition du site actif même de l'enzyme. En effet, l'ajout d'antioxydants organiques tel que le α-tocophérol protège l'enzyme de son inactivation, montrant bien qu'un mécanisme radicalaire, impliqué dans la catalyse, est à l'origine de la désactivation de l'HPO-lyase.¹⁶⁴

D'autres inhibiteurs, plus spécifiques, peuvent également être cités :

- L'acide *p*-chloromercuribenzoïque ou Hg²⁺ ce qui met en avant la présence d'un groupement thiol sur le site actif
- Le cyanure de potassium et les métaux lourds qui se trouvent être des inhibiteurs des cytochromes P450 à cause de la présence d'un noyau hème dans l'enzyme.
- Le bleu de méthylène qui inactive à plus de 80% l'enzyme.

Conclusion

Le problème de dégradation de la saveur des huiles alimentaires a motivé de nombreuses recherches. L'étude de l'autoxydation a amené à la détermination des précurseurs de rancissement. Ainsi l'acide linoléique a été mis en avant comme le principal responsable de la détérioration des huiles.³³ Néanmoins, les sources d'oxydation et les différentes voies physiques ou chimiques sont nombreuses. Le schéma 24 résume l'oxydation des huiles, des étapes d'initiation à la diversité des produits formés.

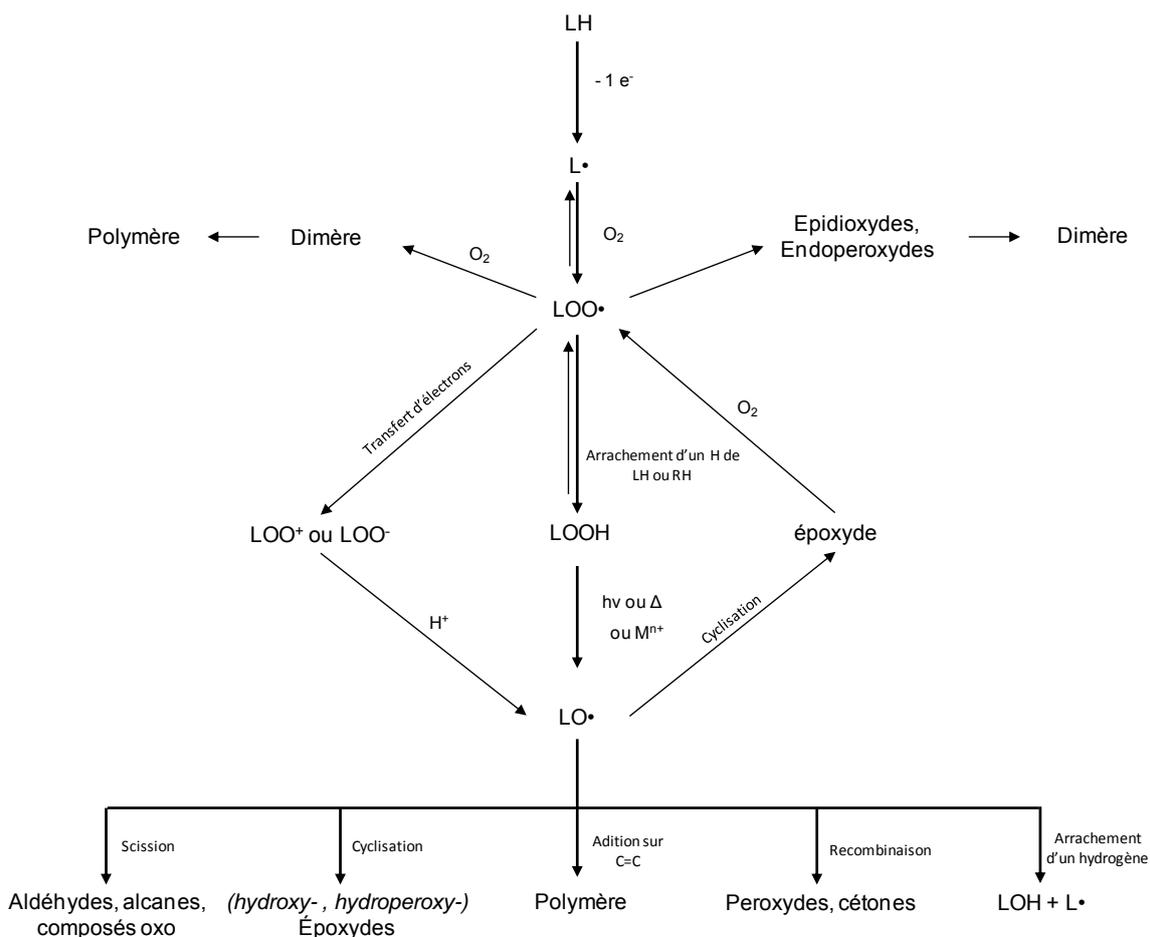


Schéma 24 : Schéma général des multiples voies réactionnelles pour l'oxydation des lipides.²⁸

Les nombreuses possibilités de détérioration des acides gras par la molécule d'oxygène sous ses états singulet ou triplet font de l'étude de leur oxydation un sujet complexe et de la protection des huiles, une nécessité. La diversité des facteurs influençant l'oxydation telle que la température, la lumière ou la nature même des huiles sont autant de paramètres à prendre en compte lors de l'étude des lipides. De nombreux complexes métalliques catalytiques et des photosensibilisateurs se trouvent naturellement dans les plantes et dans le monde animal. Ce sont des facteurs propices à l'oxydation et à la détérioration des huiles et des graisses. Ainsi, la nature les a dotés d'inhibiteurs efficaces,

désactivant l'oxygène singulet et réduisant les enzymes, pour leur fournir une protection efficace contre la toxicité résultante de la peroxydation des lipides.

Dans le cadre de cette thèse, aucune expérience ne sera réalisée sur les acides gras aux vues de la richesse de la littérature sur le sujet. D'autres composés insaturés tels que les terpènes se trouvent être facilement oxydables. Bien que moins présents dans le domaine de l'alimentaire, on les retrouve dans la parfumerie ce qui a nécessité la compréhension et la maîtrise de leur oxydation mais à moindre échelle. Le squalène, naturellement présent dans le sébum humain, est la molécule qui fait l'objet de ces travaux de thèse. Composé de six doubles liaisons oxydables, il se trouve beaucoup moins étudié que les acides gras insaturés. Tous les travaux relatifs aux acides gras, abondamment étudiés, seront transposés à ce terpène afin d'élucider les mécanismes d'oxydation du squalène et de dégradation des hydroperoxydes correspondants de ce triterpène.

Références bibliographiques du chapitre 1

1. Schweitzer, C. and R. Schmidt, Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chem. Rev.*, **2003**. *103*(5): 1685-1758.
2. Min, D.B. and J.M. Boff, Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2002**. *1*(2): 58-72.
3. Cillard, J. and P. Cillard, Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL. Oléagineux, corps gras, lipides*. *13*(1): 24-29.
4. Triantaphylidès C., Krischke M., Hoerberichts F. A., Ksas B., Gresser G., Havaux M., Van Breusegem F. and M.M. J., Singlet Oxygen Is the Major Reactive Oxygen Species Involved in Photooxidative Damage to Plants. *Plant Phys.*, **2008**. *148*(2): 960-968.
5. Ira D. Hill, R.W.T., Braja D. Mookherjee, Robin K. Wolff, *Process for augmenting or enhancing the fresh air aroma of consumable materials and clothing and composition useful for same*, **1984**, International Flavors and Fragrances, N° 535 778.
6. Mackenna, R.M.B., V.R. Wheatley and A. Wormall, The Composition of the Surface Skin Fat ('Sebum') from the Human Forearm. *J Investig Dermatol*, **1950**. *15*(1): 33-47.
7. Downing, D.T. and J.S. Strauss, Synthesis and composition of surface lipids of human skin *J Investig Dermatol*, **1974**. *62*(3), 228-244.
8. Pappas, A., Epidermal surface lipids. *Dermato-Endocrinology*, **2009**. *1*(2): 72-76.
9. Boughton, B., R.M.B. Mackenna, V.R. Wheatley and A. Wormall, The Fatty Acid Composition of the Surface Skin Fats ('Sebum') in Acne Vulgaris and Seborrheic Dermatitis. *J. Investig. Dermatol.*, **1959**. *33*(2): 57-64.
10. Munk S., Münch P., Stahnke L., Adler-Nissen J. and S. P., Primary odorants of laundry soiled with sweat/sebum: Influence of lipase on the odor profile. *J Surfact Deterg*, **2000**. *3*(4): 505-515.
11. Scharff, R.P.e.J.-P., Chimie Industrielle. Dunod ed. Sciences Sup. **1993**. 1136.
12. Ahluwalia, V.K., Enzymes for Green Organic synthesis. **2010**, Oxford: Alpha science International Ltd. 190.
13. Voelker, T. and A.J. Kinney, Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annu. Rev. Plant Phys.*, **2001**. *52*(1): 335-361.
14. Holman, R.T., Spectrophotometric studies of the oxidation of fats; oxygen absorption and chromophore production in lipoxidase-oxidized fatty esters. *Arch Biochem*, **1946**. *10*: 519-29.
15. Galliard, T., D.A. Wardale and J.A. Mathew, The enzymic and non-enzymic degradation of colneleic acid, an unsaturated fatty acid ether intermediate in the lipoxygenase pathway of linoleic acid oxidation in potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Biochem J*, **1974**. *138*: 23-31.
16. Fauconnier M.L., Marlier M., Revue bibliographique: les lipoxygénases du soja, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **1997**, *1*(2), 125-141.
17. Nardello-Rataj, V., L. Ho Tan Tai and J.M. Aubry, Les lessives en poudre *L'actualité chimique*, **2003**: 3-5.

18. Boland, W., C. Fröbl and M. Lorenz, Esterolytic and Lipolytic Enzymes in Organic Synthesis. *Synthesis*, **1991**. 1991(12): 1049-1072.
19. Medina, J.C. and K.S. Kyler, Enzymic cyclization of hydroxylated surrogate squalenoids with bakers' yeast. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**. 110: 4818-21.
20. Geiger, M., J. Bauer and P. Cirpus, *Genetic engineering of Brassicaceae and other plants to produce arachidonic acid and/or eicosapentaenoic acid*, **2008**, BASF Plant Science G.m.b.H., Germany . WO2008009600A1
21. Schaich, K.M., Metals and lipid oxidation. Contemporary issues. *Lipids*, **1992**. 27(3): 209-218.
22. Hebert, A., Effect of Metals in the Heat on Fatty Acids. [machine translation]. *C. R. D. l'Acad. des Sciences*, **1903**. 136: 682-84.
23. Soucek, M.D., T. Khattab and J. Wu, Review of autoxidation and driers. *Prog. Org. Coat.*, **2012**. 73(4): 435-454.
24. Brash, A., Autoxidation of methyl linoleate: Identification of the bis-allylic 11-hydroperoxide. *Lipids*, **2000**. 35(9): 947-952.
25. Chi, Y.-S. and S.K. Obendorf, Aging of oily soils on textile materials: A literature review. *Journal of Surfactants and Detergents*, **1998**. 1(3): 407-418.
26. Frankel, E.N., Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1984**. 61: 1908-17.
27. Velasco, J.n., M.L. Andersen and L.H. Skibsted, Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chem.*, **2004**. 85(4): 623-632.
28. Schaich, K.M., Lipid Oxidation: Theoretical Aspects, in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. **2005**, John Wiley & Sons, Inc.
29. Hecht, E., *Physiscs: Calculus*. 2nd edition ed. **2000**, Pacific Grove: Brooks/Cole.
30. Brown, R., *Excited states and free radicals in biology and medicine*: edited by R.V. Bensasson, E.J. Land and T.G. Truscott, Oxford University Press, 1993. *J. Photochem. Photobio. A*, **1995**. 85(1-2): 197.
31. Howard, J.A., Free radicals. in J.K. Kochi, edition ed. *Vol. 2*. **1973**, New York: Wiley Intersciences. 3-62.
32. Porter, N., S. Caldwell and K. Mills, Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, **1995**. 30(4): 277-290.
33. Frankel, E.N., Lipid oxidation. *Prog. Lipid Res.*, **1980**. 19(1-2): 1-22.
34. Rontani J.-F., J.I., Christodoulou S., Volkman J. K., Free radical oxidation (autoxidation) of alkenones and other lipids in cells of *Emiliana huxleyi*. *Phytochemistry*, **2007**. 68(6): 913-924.
35. Frankel, E.N., Chemistry of autoxidation: mechanism, products and flavor significance. *AOCS Monogr.*, **1985**. 15: 1-37.

36. Bergstrom, S., Autoxidation of linoleic acid. *Nature (London, U. K.)*, **1945**. 156: 717-18.
37. Schneider, C., N.A. Porter and A.R. Brash, Routes to 4-Hydroxynonenal: Fundamental Issues in the Mechanisms of Lipid Peroxidation. *J. Biol. Chem.*, **2008**. 283(23): 15539-15543.
38. Wilkinson, F., W.P. Helman and A.B. Ross, Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1995**. 24(2): 663-677.
39. Greer, A., Christopher Foote's Discovery of the Role of Singlet Oxygen [1O_2 ($^1\Delta_g$)] in Photosensitized Oxidation Reactions. *Acc. Chem. Res.*, **2006**. 39(11): 797-804.
40. Choe, E. and D.B. Min, Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr. Rev. Food Sc. F.*, **2006**. 5(4): 169-186.
41. Mistry, B.S. and D.B. Min, Effects of fatty acids on the oxidative stability of soybean oil. *J. Food Sci.*, **1987**. 52: 831-2.
42. Bhalerao, V.R., M.G. Kokatnur and F.A. Kummerow, The effect of 12, oxo-cis, 9-octadecenoic acid on the autoxidation of stripped corn oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1962**. 39(1): 28-30.
43. Abuzaytoun, R. and F. Shahidi, Oxidative Stability of Algal Oils As Affected by Their Minor Components. *J. Agric. Food. Chem.*, **2006**. 54(21): 8253-8260.
44. Rawls, H.R. and P.J. Santen, A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1970**. 47(4): 121-125.
45. DeRosa, M.C. and R.J. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**. 233-234(0): 351-371.
46. Kim, H.J., *Oxidation mechanism of riboflavin destruction and antioxidant mechanism of tocotrienols*. 2007, Ohio State University.
47. Grossweiner, L.I. *Singlet oxygen: generation and properties*.
48. Huang, R., E. Choe and D.B. Min, Effects of Riboflavin Photosensitized Oxidation on the Volatile Compounds of Soymilk. *J. Food Sci.*, **2004**. 69(9): C733-C738.
49. Nyman, E.S. and P.H. Hynninen, Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobio. B*, **2004**. 73(1-2): 1-28.
50. Shimizu, N. and P.D. Bartlett, Photooxidation of olefins sensitized by α -diketones and by benzophenone. A practical epoxidation method with biacetyl. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**. 98: 4193-200.
51. Aubry, J.M. and S. Bouttemy, Preparative Oxidation of Organic Compounds in Microemulsions with Singlet Oxygen Generated Chemically by the Sodium Molybdate/Hydrogen Peroxide System. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**. 119(23): 5286-5294.
52. Aubry, J.M. and V. Nardello, Generation of singlet oxygen from the catalytic system $H_2O_2/Ca(OH)_2$ and applications to the selective oxidation of unsaturated compounds, in *Stud. Surf. Sci. Catal.*, S. T. O. A. M. G. R.K. Grasselli and J. E. Lyons, Editors. **1997**, Elsevier. p. 883-892.

-
53. Aubry, J.M., Search for singlet oxygen in the decomposition of hydrogen peroxide by mineral compounds in aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**. *107*: 5844-9.
 54. Nardello, V., M.-J. Marti, C. Pierlot and J.M. Aubry, Photochemistry without Light: Oxidation of Rubrene in a Microemulsion with a Chemical Source of Singlet Molecular Oxygen (1O₂, 1Dg). *J. Chem. Educ.*, **1999**. *76*(9): 1285.
 55. Tanielian, C. and R. Mechin, Reactions of singlet oxygen with polyisoprene and model compounds. *Tetrahedron*, **1985**. *41*(11): 2139-2146.
 56. Foote, C.S., Photosensitized oxygenations and the role of singlet oxygen. *Accounts Chem. Res.*, **1968**. *1*: 104-10.
 57. Merkel, P.B. and D.R. Kearns, Remarkable solvent effects on the lifetime of 1.DELTA.g oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**. *94*(3): 1029-1030.
 58. Stratakis, M. and M. Orfanopoulos, Regioselectivity in the Ene Reaction of Singlet Oxygen with Alkenes. *Tetrahedron*, **2000**. *56*(12): 1595-1615.
 59. Harding, L.B. and W.A. Goddard, The mechanism of the ene reaction of singlet oxygen with olefins. *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**. *102*(2): 439-449.
 60. Griesbeck, A.G. and M. Cho, Singlet oxygen addition to homoallylic substrates in solution and microemulsion: novel secondary reactions. *Tetrahedron Lett.*, **2009**. *50*(1): 121-123.
 61. Maranzana, A., G. Ghigo and G. Tonachini, Mechanistic Significance of Peroxide Trapping Experiments, with Epoxide Detection, in 1Δg Dioxygen Reactions with Alkenes. *J. Org. Chem.*, **2003**. *68*(8): 3125-3129.
 62. Clennan, E.L., New Mechanistic and Synthetic Aspects of Singlet Oxygen Chemistry. *Tetrahedron*, **2000**. *56*(47): 9151-9179.
 63. Kohno, Y., Y. Egawa, S. Itoh, S.-i. Nagaoka, M. Takahashi and M. K., Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *BBA - Lipid Lipid Met.*, **1995**. *1256*(1): 52-56.
 64. SAHYUN, M.R.V., *Encyclopedia of chemical technology: photochemical technology.*, in *Encyclopedia of chemical technology*, K. Othmer, Editor. 1998.
 65. Nardello, V., L. Caron, J.-M. Aubry, S. Bouttemy, T. Wirth, C.R. Saha-Möller and W. Adam, Reactivity, Chemoselectivity, and Diastereoselectivity of the Oxyfunctionalization of Chiral Allylic Alcohols and Derivatives in Microemulsions: Comparison of the Chemical Oxidation by the Hydrogen Peroxide/Sodium Molybdate System with the Photooxygenation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**. *126*(34): 10692-10700.
 66. Nakajima, A. and H. Hidaka, Photosensitized oxidation of oleic acid, methyl oleate, and olive oil using visible light. *J. Photochem. Photobio. A*, **1993**. *74*(2-3): 189-194.
 67. Rawls, H.R. and P.J. van Santen, Singlet oxygen: A possible source of the original hydroperoxides in fatty acids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1970**. *171*(1): 135-137.
 68. Chan, H.S., Photo-sensitized oxidation of unsaturated fatty acid methyl esters. The identification of different pathways. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1977**. *54*(3): 100-104.
-

-
69. Neumann, M., S. Fusero and N. García, A comparative study on the susceptibilities of soybean, sunflower and peanut oils to singlet molecular oxygen photooxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1991**. 68(9): 662-665.
70. Neff, W.E., E.N. Frankel and D. Weisleder, Photosensitized oxidation of methyl linolenate. Secondary products. *Lipids*, **1982**. 17(11): 780-790.
71. Neff, W.E., Frankel, E. N., Selke, E., Weisleder, D., Photosensitized oxidation of methyl linoleate monohydroperoxides: Hydroperoxy cyclic peroxides, dihydroperoxides, keto esters and volatile thermal decomposition products. *Lipids*, **1983**. 18(12): 868-876.
72. Velasco, J. and C. Dobarganes, Oxidative stability of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2002**. 104: 661-676.
73. Labuza, T.P., M. Silver, M. Cohn, N.D. Heidelbaugh and M. Karel, Metal-catalyzed oxidation in the presence of water in foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1971**. 48(10): 527-531.
74. Erben-Russ, M., C. Michel, W. Bors and M. Saran, Absolute rate constants of alkoxy radical reactions in aqueous solution. *J. Phys. Chem.*, **1987**. 91: 2362-5.
75. Howard, J.A. and K.U. Ingold, Absolute rate constants for hydrocarbon autoxidation. VI. Alkyl aromatic and olefinic hydrocarbons. *Can. J. Chem.*, **1967**. 45(8): 793-802.
76. Kim, S.S., S.Y. Kim, S.S. Ryou, C.S. Lee and K.H. Yoo, Solvent effects in the hydrogen abstractions by tert-butoxy radical: veracity of the reactivity/selectivity principle. *J. Org. Chem.*, **1993**. 58: 192-6.
77. Avila, D.V., K.U. Ingold, J. Luszyk, W.H. Green and D.R. Procopio, Dramatic Solvent Effects on the Absolute Rate Constants for Abstraction of the Hydroxylic Hydrogen Atom from tert-Butyl Hydroperoxide and Phenol by the Cumyloxy Radical. The Role of Hydrogen Bonding. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**. 117: 2929-30.
78. Ingold, K.U., Peroxy radicals. *Accounts Chem. Res.*, **1969**. 2: 1-9.
79. Walling, C. and A. Padwa, Positive halogen compounds. VI. Effects of structure and medium on the β -scission of alkoxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**. 85: 1593-7.
80. Factor, A., C.A. Russell and T.G. Traylor, Bimolecular combination reactions of oxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**. 87: 3692-8.
81. Bascetta E., G.F.D., Scrimgeour C. M., Walton J. C., ESR observation of pentadienyl and allyl radicals on hydrogen abstraction from unsaturated lipids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**: 110-12.
82. Walling, C. and P.J. Wagner, Positive halogen compounds. X. Solvent effects in the reactions of tert-butoxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**. 86(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 3368-75.
83. Walling, C. and P. Wagner, Effects of solvent on transition states in the reactions of tertbutoxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**. 85: 2333-4.
84. Kochi, J.K., Chemistry of alkoxy radicals: cleavage reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**. 84: 1193-7.
85. Tsentalovich, Y.P., L.V. Kulik, N.P. Gritsan and A.V. Yurkovskaya, Solvent Effect on the Rate of β -Scission of the tert-Butoxyl Radical. *J. Phys. Chem. A*, **1998**. 102(41): 7975-7980.
-

-
86. Simic, M.G., Free radical mechanisms in autoxidation processes. *J. Chem. Educ.*, **1981**. 58(2): 125.
 87. Ellis, R., A.M. Gaddis, G.T. Currie and S.L. Powell, Carbonyls in oxidizing fat: XII. The isolation of free aldehydes from autoxidized triolein, trilinolein and trilinolenin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1968**. 45(8): 553-559.
 88. Avila, D.V., C.E. Brown, K.U. Ingold and J. Lusztyk, Solvent effects on the competitive β -scission and hydrogen atom abstraction reactions of the cumyloxyl radical. Resolution of a long-standing problem. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**. 115: 466-70.
 89. Mayo, F.R., A.A. Miller and G.A. Russell, The oxidation of unsaturated compounds. IX. The effects of structure on the rates and products of oxidation of unsaturated compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**. 80: 2500-07.
 90. Chan, H.S., F.A. Prescott and P.T. Swoboda, Thermal decomposition of individual positional isomers of methyl linoleate hydroperoxide: Evidence of carbon-oxygen bond scission. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1976**. 53(9): 572-576.
 91. Nawar, W.W., Thermal degradation of lipids. *J. Agr. Food Chem.*, **1969**. 17: 18-21.
 92. Baciocchi, E., M. Bietti, M. Salamone and S. Steenken, Spectral Properties and Absolute Rate Constants for β -Scission of Ring-Substituted Cumyloxyl Radicals. A Laser Flash Photolysis Study. *J. Organ. Chem.*, **2002**. 67(7): 2266-2270.
 93. Fukuzumi, S. and J.K. Kochi, Electrophilic additions to olefins. A new approach to unifying the mechanisms of bromination and oxymercuration. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**. 103: 2783-91.
 94. Wilsey, S., P. Dowd and K.N. Houk, Effect of Alkyl Substituents and Ring Size on Alkoxy Radical Cleavage Reactions. *J. Organ. Chem.*, **1999**. 64(24): 8801-8811.
 95. Chan, H.W.S., J.A. Matthew and D.T. Coxon, A hydroperoxyepidioxide from the autoxidation of a hydroperoxide of methyl linolenate. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1980**: 235-6.
 96. Porter, N.A., L.S. Lehman, B.A. Weber and K.J. Smith, Unified mechanism for polyunsaturated fatty acid autoxidation. Competition of peroxy radical hydrogen atom abstraction, β -scission, and cyclization. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**. 103: 6447-55.
 97. Porter, N.A., M.O. Funk, D. Gilmore, R. Isaac and J. Nixon, The formation of cyclic peroxides from unsaturated hydroperoxides: models for prostaglandin biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**. 98(19): 6000-6005.
 98. Baldwin, J.E., Rules for ring closure. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1976**: 734-6.
 99. Porter, N.A., Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc. Chem. Res.*, **1986**. 19: 262-8.
 100. Van Sickle, D.E., F.R. Mayo, E.S. Gould and R.M. Arluck, Effects of experimental variables in oxidations of alkenes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**. 89: 977-84.
 101. Wu, G.-S., R. Stein and J. Mead, Autoxidation of fatty acid monolayers adsorbed on silica gel: II. Rates and products. *Lipids*, **1977**. 12(11): 971-978.
 102. Wu, G.-S., R. Stein and J. Mead, Autoxidation of fatty acid monolayers adsorbed on silica gel: III. Effects of saturated fatty acids and cholesterol. *Lipids*, **1978**. 13(8): 517-524.
-

-
103. Dix, T.A. and L.J. Marnett, Free radical epoxidation of 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene by hematin and polyunsaturated fatty acid hydroperoxides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**. *103*: 6744-6.
104. Neff, W.E. and E.N. Frankel, Quantitative analyses of hydroxystearate isomers from hydroperoxides by high pressure liquid chromatography of autoxidized and photosensitized-oxidized fatty esters. *Lipids*, **1980**. *15*(8): 587-590.
105. Neff, W.E., E.N. Frankel and D. Weisleder, High-pressure liquid chromatography of autoxidized lipids. II. Hydroperoxy-cyclic peroxides and other secondary products from methyl linolenate. *Lipids*, **1981**. *16*: 439-48.
106. Hiatt, R. and T. McCarrick, Bimolecular initiation by hydroperoxides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**. *97*: 5234-7.
107. Elson, I.H., S.W. Mao and J.K. Kochi, Electron spin resonance study of addition of alkoxy radicals to olefins. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**. *97*: 335-41.
108. Lewis, F.M. and F.R. Mayo, Copolymerization. IX. Comparison of some cis and trans isomers. *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**. *70*: 1533-6.
109. Frankel E. N., N.W.E., Selke E., Brooks D. D., Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: X. Volatile thermal decomposition products of methyl linolenate dimers. *Lipids*, **1988**. *23*(4): 295-298.
110. Haynes, R.K. and S.C. Vonwiller, Iron(III) and copper(II)-catalyzed transformations of fatty acid hydroperoxides: efficient generation of peroxy radicals with copper(II) trifluoromethanesulfonate. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**: 1102-4.
111. Hiatt, R., C.W. Gould and F.R. Mayo, Decompositions of hydroperoxides in oxidizing olefins. *J. Org. Chem.*, **1964**. *29*: 3461-6.
112. Kalua C. M., A.M.S., Bedgood Jr D. R., Bishop A. G., Prenzler P. D., Robards K., Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chem.*, **2007**. *100*(1): 273-286.
113. Herrmann, A., Controlled Release of Volatiles under Mild Reaction Conditions: From Nature to Everyday Products. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**. *46*(31): 5836-5863.
114. Frankel, E.N., W.E. Neff and E. Selke, Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry. IX. Homolytic vs. Heterolytic cleavage of primary and secondary oxidation products. *Lipids*, **1984**. *19*(10): 790-800.
115. Uri, N., Physico-chemical aspects of autoxidation. *Autoxidation Antioxidants* **1961**. *1*: 55-106.
116. Dauben, W.G., M.E. Lorber and D.S. Fullerton, Allylic oxidation of olefins with chromium trioxide pyridine complex. *J. Org. Chem.*, **1969**. *34*: 3587-92.
117. Ikeda, N. and K. Fukuzumi, Prooxidant effects of inorganic chromium compounds in the autoxidation of methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1977**. *54*(3): 105-109.
118. Hirano, M., K. Nakamura and T. Morimoto, Oxidation by cobalt(III) acetate. Part 3. Allylic oxidation of various olefins in acetic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1981**: 817-20.
119. Smith, P. and W.A. Waters, Oxidation of organic compounds by cobaltic salts. XII. Oxidations of unsaturated acids. *J. Chem. Soc. B*, **1969**: 462-7.
-

-
120. Clifford, A.A. and W.A. Waters, Oxidations of organic compounds by cobaltic salts. VI. Kinetic and product studies of the oxidations of some carboxylic acids. *J. Chem. Soc.*, **1965**: 2796-804.
 121. Cooper, T.A. and W.A. Waters, Oxidations of organic compounds by cobaltic salts. III. Oxidation of aromatic aldehydes. *J. Chem. Soc.*, **1964**: 1538-43.
 122. Bawn, C.E.H., T.P. Hobin and L. Raphael, The Metal-Salt-Catalyzed Oxidation of Acetaldehyde. *P. Roy. Soc. Lond. A Mat.*, **1956**. 237(1210): 313-324.
 123. Waters, W.A., The kinetics and mechanism of metal-catalyzed autoxidation. *J Am Oil Chem Soc*, **1971**. 48(9): 427-433.
 124. Chalk, A.J. and J.F. Smith, Catalysis of cyclohexane autoxidation by trace metals in nonpolar media. II. Metal salts in the presence of chelating agents. *Trans. Faraday Soc.*, **1957**. 53: 1235-45.
 125. Chalk, A.J. and J.F. Smith, Catalysis of cyclohexane autoxidation by trace metals in nonpolar media. I. Metal salts. *Trans. Faraday Soc.*, **1957**. 53: 1214-34.
 126. Walling, C., Fenton's reagent revisited. *Acc. Chem. Res.*, **1975**. 8: 125-31.
 127. Black, J.F., Metal-catalyzed autoxidation. The unrecognized consequences of metal-hydroperoxide complex formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**. 100: 527-35.
 128. Bawn, C.E.H. and J.E. Jolley, The Cobalt-Salt-Catalyzed Autoxidation of Benzaldehyde. *P. Roy. Soc. Lond. A Mat.*, **1956**. 237(1210): 297-312.
 129. Scott, E.J.Y. and A.W. Chester, Kinetics of the cobalt-catalyzed autoxidation of toluene in acetic acid. Role of cobalt. *J. Phys. Chem.*, **1972**. 76: 1520-4.
 130. Sheldon, R.A. and J.K. Kochi, Metal-Catalyzed Oxidations of Organic Compounds. **1981**: Academic Press. 424 pp.
 131. Rollick, K.L. and J.K. Kochi, Oxidation-reduction mechanisms. Inner-sphere and outer-sphere electron transfer in the reduction of iron(III), ruthenium(III), and osmium(III) complexes by alkyl radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**. 104: 1319-30.
 132. Copping, C. and N. Uri, Catalytic and inhibitory effects of metal chelates in autoxidation reaction. *Discuss. Faraday Soc.*, **1968**. No. 46: 202-12.
 133. Wallace, T.J. and R.M. Skomoroski, Primary and secondary metal catalysis in hydrocarbon autoxidations. *Chem. Ind. (London, U. K.)*, **1965**: 348-9.
 134. Heaton, F.W. and N. Uri, The aerobic oxidation of unsaturated fatty acids and their esters: cobalt stearate-catalyzed oxidation of linoleic acid. *J. Lipid Res.*, **1961**. 2: 152-60.
 135. De Klerk, A., Influence of Stainless Steel on the Autoxidation of Fischer-Tropsch Waxes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2004**. 43(21): 6898-6900.
 136. Gutteridge, B.H.a.J., Free Radicals in Biology and Medicine. 4th edition ed. **May 2007**. 704.
 137. Bray, W.C. and M.H. Gorin, Ferryl ion, a compound of quadrivalent iron. *J. Am. Chem. Soc.*, **1932**. 54: 2124-5.
-

-
138. Walling, C., Intermediates in the Reactions of Fenton Type Reagents. *Acc. Chem. Res.*, **1998**. *31(4)*: 155-157.
139. Bossmann, S.H., E. Oliveros, S. Goeb, S. Siegwart, E.P. Dahlen, L.J. Payawan, M. Straub, M. Woerner and A.M. Braun, New Evidence against Hydroxyl Radicals as Reactive Intermediates in the Thermal and Photochemically Enhanced Fenton Reactions. *J. Phys. Chem. A*, **1998**. *102*: 5542-5550.
140. Tung, H.C., C. Kang and D.T. Sawyer, Nature of the reactive intermediates from the iron-induced activation of hydrogen peroxide: agents for the ketonization of methylenic carbons, the monooxygenation of hydrocarbons, and the dioxygenation of aryl olefins. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**. *114*: 3445-55.
141. Rush, J.D. and W.H. Koppenol, Reactions of iron(II) nitilotriacetate and iron(II) ethylenediamine-N,N'-diacetate complexes with hydrogen peroxide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**. *110*: 4957-63.
142. Ensing, B. and E.J. Baerends, Reaction Path Sampling of the Reaction between Iron(II) and Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. A*, **2002**. *106*: 7902-7910.
143. Kaizer J., K.E.J., Oh Na Y., Rohde J.-U., Song W. Ju, Stubna A., Kim J., Münck E., Nam W., Que L., Nonheme FeIVO Complexes That Can Oxidize the C-H Bonds of Cyclohexane at Room Temperature. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**. *126(2)*: 472-473.
144. Kaizer, J., M. Costas and L. Que, A Dramatic Push Effect on the Homolysis of FeIII(OOR) Intermediates To Form Non-Heme FeIV=O Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**. *42(31)*: 3671-3673.
145. Bassan, A., M.R.A. Blomberg, P.E.M. Siegbahn and L. Que, A Density Functional Study of O-O Bond Cleavage for a Biomimetic Non-Heme Iron Complex Demonstrating an FeV-Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**. *124(37)*: 11056-11063.
146. Gigot, C., M. Ongena, M.-L. Fauconnier, J.-P. Wathélet, P. Jardin and P. Thonart, The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2010**. *14(3)*: 451-460.
147. Hatanaka, A., T. Kajiwara and J. Sekiya, Biosynthetic pathway for C6-aldehydes formation from linolenic acid in green leaves. *Chem. Phys. Lipids*, **1987**. *44(2-4)*: 341-361.
148. Vick, B.A. and D.C. Zimmerman, Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway, in *The biochemistry of plants, a comprehensive treatise*. **1988**. p. 53-90.
149. Gardner, H.W., Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1991(1084)**: 221-239.
150. Croft, K., F. Juttner and A.J. Slusarenko, Volatile Products of the Lipoxygenase Pathway Evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) Leaves Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiology*, **1993**. *101(1)*: 13-24.
151. Hou, E.A.K., Sur la présence d'une oxydase des lipides ou lipoxydase dans la graine de soja. *C.R. Acad. Sci.*, **1932**. *194*: 645-647.
152. Streckert, G. and H.-J. Stan, Conversion of linoleic acid hydroperoxide by soybean lipoxygenase in the presence of guaicol: Identification of the reaction products. *Lipids*, **1975**. *10(12)*: 847-854.
-

-
153. Gargouri, M. and M.-D. Legoy, Biosynthesis and analysis of 3Z-nonenal. *Biotechnol. Lett.*, **1998**, 20(1): 23-26.
154. Mohamed Gargouri, N.B.A., Faten Kotti, Ines Ben Rejeb, Voie de la lipoxygénase: valorisation d'huiles végétales et biosynthèse de flaveurs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2008**, 12(2): 185-202.
155. Brash, A.R., Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(34): 23679-23682.
156. Aoshima, H., T. Kajiwara, A. Hatanaka and H. Hatano, Electron Spin Resonance Studies on the Lipoxygenase Reaction by Spin Trapping and Spin Labelling Methods. *J. Biochem.*, **1977**, 82(6): 1559-1565.
157. Egmond, M.R., J.F.G. Vliegthart and J. Boldingh, Stereospecificity of the hydrogen abstraction at carbon atom n-8 in the oxygenation of linoleic acid by lipoxygenases from corn germs and soya beans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1972**, 48(5): 1055-1060.
158. De Groot, J.J.M.C., G.J. Garssen, G.A. Veldink, J.F.G. Vliegthart, J. Boldingh and M.R. Egmond, On the interaction of soybean lipoxygenase-1 and 13-L-hydroperoxylinoleic acid, involving yellow and purple coloured enzyme species. *FEBS Lett.*, **1975**, 56(1): 50-54.
159. Kermasha, S., N. Dioum, B. Bisakowski and M. Vega, Biocatalysis by immobilized lipoxygenase in a ternary micellar system. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2002**, 19-20(0): 305-317.
160. Romero, M.V. and D.M. Barrett, Rapid Methods for Lipoxygenase Assay in Sweet Corn. *J. Food Sci.*, **1997**, 62(4): 696-700.
161. Piazza, G., Lipoxygenase catalyzed hydroperoxide formation in microemulsions containing nonionic surfactant. *Biotechnol. Lett.*, **1992**, 14(12): 1153-1158.
162. Aoshima, H., T. Kajiwara and A. Hatanaka, Decomposition of Lipid Hydroperoxide by Soybean Lipoxygenase-1 under Aerobic Conditions Studied by High Performance Liquid Chromatography and the Spin Trapping Method. *Agr. Biol. Chem.*, **1981**, 45(10): 2245-2251.
163. Vick, B.A. and D.C. Zimmerman, Lipoxygenase and Hydroperoxide Lyase in Germinating Watermelon Seedlings. *Plant Physiol.*, **1976**, 57(5): 780-788.
164. Marlier, M.-L.F.a.M., Fatty acid hydroperoxides pathways in plants. A review. *Grasas y Aceites*, **1997**, 48(1): 30-37.
165. Salas, J.n.J. and J. Sánchez, Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruits. *Plant Sci.*, **1999**, 143(1): 19-26.
166. Grechkin, A.N. and M. Hamberg, The "heterolytic hydroperoxide lyase" is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal. *BBA - Mol. Cell Biol. L.*, **2004**, 1636(1): 47-58.
167. Gardner, H.W., D. Weisleder and R.D. Plattner, Hydroperoxide Lyase and Other Hydroperoxide-Metabolizing Activity in Tissues of Soybean, *Glycine max.* *Plant Physiology*, **1991**, 97(3): 1059-1072.
168. Jerome Delcarte, M.L.F., Phryné Hoyaux, Philippe Jacques, Philippe Thonart, Michel Marlier, Revue bibliographique: l'hydroperoxyde lyase. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2000**, 4(3): 157-167.
-

-
169. Assaf, S., Y. Hadar and C.G. Dosoretz, Biosynthesis of 13-hydroperoxylinoleate, 10-oxo-8-decenoic acid and 1-octen-3-ol from linoleic acid by a mycelial-pellet homogenate of *Pleurotus pulmonarius*. *J. Agric. Food. Chem.*, **1995**. *43(8)*: 2173-2178.
170. Salch, Y.P., Grove; M. J., H. Takamura and H.W. Gardner, Characterization of a C-5,13-Cleaving Enzyme of 13(S)-Hydroperoxide of Linolenic Acid by Soybean Seed. *Plant Physiol.*, **1995**. *108(3)*: 1211-1218.
171. Zhuang, H., T.R. Hamilton-Kemp, R.A. Andersen and D.F. Hildebrand, Developmental Change in C6-Aldehyde Formation by Soybean Leaves. *Plant Physiol.*, **1992**. *100(1)*: 80-87.
172. Drawert F., H.W., Emberger R., Tressl R., Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten, II. Enzymatische Bildung von Hexen-(2)-al-(1), Hexanal und deren Vorstufen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1966**. *694(1)*: 200-208.
173. Kim, I.-S. and W. Grosch, Partial purification and properties of a hydroperoxide lyase from fruits of pear. *J. Agric. Food. Chem.*, **1981**. *29(6)*: 1220-1225.
174. Matthew, J.A. and T. Galliard, Enzymic formation of carbonyls from linoleic acid in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochem.*, **1978**. *17(6)*: 1043-1044.
175. A. Hatanaka, T.K., K. Matsui & A. Kitamura, Expression of lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in tomato fruits. *Z. Naturforsch.*, **1992**. *47*: 369-374.
176. Matoba, T., H. Hidaka, H. Narita, K. Kitamura, N. Kaizuma and M. Kito, Lipoxygenase-2 isozyme is responsible for generation of n-hexanal in soybean homogenate. *J. Agric. Food. Chem.*, **1985**. *33(5)*: 852-855.
177. Rehbock, B., D. Ganßer and R.G. Berger, Efficient generation of 2E-hexenal by a hydroperoxide lyase from mung bean seedlings. *Food Chem.*, **1998**. *63(2)*: 161-165.
178. Matsui, K., Y. Kaji, T. Kajiwara and A. Hatanaka, Developmental changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in cultured cells of *Marchantia polymorpha*. *Phytochem.*, **1996**. *41(1)*: 177-182.
179. Matsui K., S.M., Hase T., Kajiwara T., Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Lett.*, **1996**. *394(1)*: 21-24.
180. Hatanaka, A., The fresh green odor emitted by plants. *Food Rev. Intern.*, **1996**. *12(3)*: 303-350.
181. Sekiya, J., K. Munechika and A. Hatanaka, Further Characterization of C₆-Aldehyde-forming System in Alfalfa Cells Cultured *in vitro*. *Agri. Biol. Chem.*, **1983**. *47(7)*: 1647-1648.

Chapitre II _____

Peroxydation du Squalène et Dégradation des Hydroperoxydes en Molécules Volatiles

Ce second chapitre est dédié à l'étude de la **dégradation oxydante du squalène**. Pour des raisons pratiques, nous avons fait le choix de le présenter sous la forme de deux publications, l'une relative à **l'oxydation du squalène par l'oxygène singulet** engendré photochimiquement et chimiquement par décomposition de l'eau oxygénée catalysée par les ions molybdates, l'autre traitant de la **décomposition thermique des hydroperoxydes de squalène en composés volatiles**. Dans les deux cas, les études réalisées nous ont amenés à développer, adapter et utiliser un certain nombre de techniques, complémentaires, permettant de détecter et d'identifier les nombreux produits d'oxydation primaires (i.e. les hydroperoxydes) et secondaires (i.e. les volatiles) dans l'objectif d'élucider le mécanisme de dégradation oxydante du squalène conduisant à la libération d'une odeur agréable.

Analyse bibliométrique de la littérature relative à l'oxydation du squalène :

En guise d'introduction aux deux publications, nous avons réalisé une petite analyse bibliométrique des travaux reportés dans la littérature relatifs au squalène lui-même et à son oxydation par l'oxygène. Comme nous avons pu le montrer dans le chapitre 1, la littérature concernant l'oxydation des acides gras insaturés est très riche. Elle l'est beaucoup moins dans le cas du squalène puisque l'on recense 1117 publications et 332 brevets contre 9817 et 2338 respectivement dans le cas des acides gras insaturés.

Le mot-clé «squalene » dans la base de données *Scifinder*[®] répond à 14 751 références, tous types de documents confondus. L'analyse générale des journaux et des brevets dévoile une implication de ce composé dans divers domaines d'activité (Figure 1). La biochimie et l'étude des métabolismes des végétaux et des mammifères couvrent 32% des références, suivi par le secteur de la pharmacie. Ce composé naturel présente également un intérêt en cosmétique d'après les 6% correspondant à cette spécialité, notamment de par sa présence naturelle à la surface de la peau. Il est également rencontré comme matière première dans la formulation de produits de soin corporel.

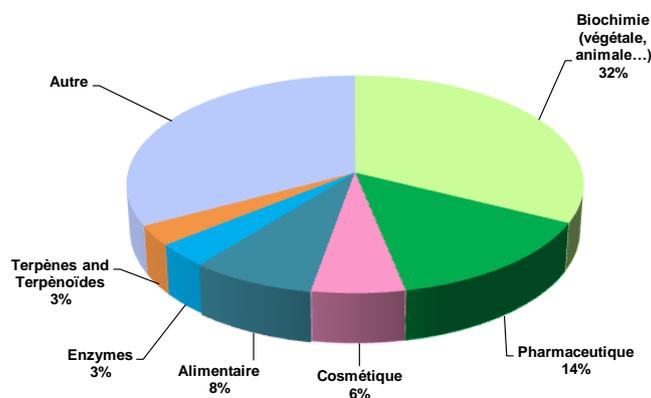


Figure 1. Répartition des domaines d'application recensés sur *Scifinder*[®] (journaux et brevets) pour le squalène.

La première publication relative au squalène remonte à 1916. En revanche, le premier brevet date de 1928 (figure 2). Il décrivait la composition d'une feuille de pochoir à base d'esters de polysaccharides et de squalène,¹ tandis que l'article de Tsujimoto expose simplement les caractéristiques de cet hydrocarbure insaturé présent dans l'huile de requin.²

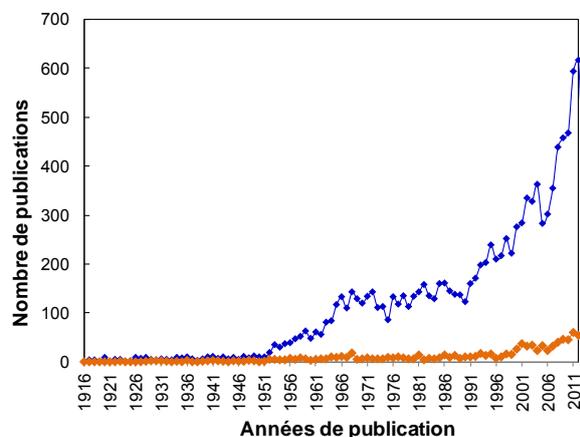


Figure 2. Evolution du nombre de publications dans des journaux concernant le squalène (en bleu) et l'oxydation du squalène (en orange)

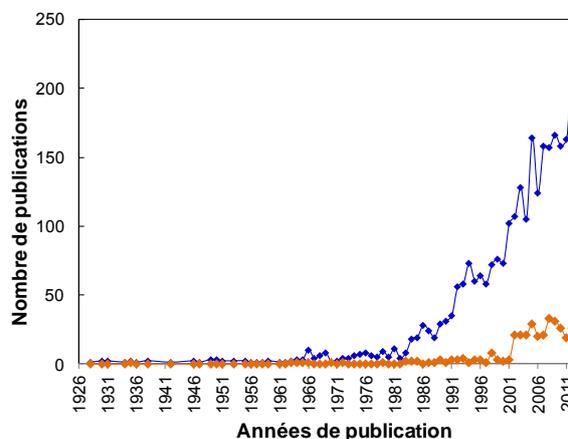


Figure 3. Evolution du nombre de brevets concernant le squalène (en bleu) et l'oxydation du squalène (en orange)

En ce qui concerne les travaux décrivant l'oxydation du squalène, on constate que le premier article date de 1923 tandis que le premier brevet date de 1935 (figure 3) dans lequel sont décrits les produits de condensation dérivés des composés glyoxal dianthraquinone.³ Le second brevet date de 1963 et aborde des additifs dans les lubrifiants.⁴ La décomposition oxydante du squalène en composés parfumés, par traitement thermique, en présence de V_2O_5 ou de charbon actif et d'air, a été brevetée pour la première fois en 1972.⁵ Cependant, en 1923, la première publication détaillait l'oxydation du squalène, autrement appelé le « spinacene », en présence de divers oxydants tels que l'acide nitrique, le peroxyde de benzoyle ou encore le peroxyde d'hydrogène. Elle faisait également état de sa dégradation sous l'action de la chaleur.⁶ Par ailleurs, ce composé hexa-insaturé a également été étudié de nombreuses fois comme antioxydant,⁷ en particulier dans les huiles étant donné qu'il se trouve être plus réactif au contact de l'oxygène que les acides gras insaturés eux-mêmes. En 2013, on le retrouve principalement au cœur de recherches concernant la nutrition,⁸ la pollution de l'air (dans les cabines d'avion, par exemple, où l'interaction de l'ozone et du squalène libère du 6-méthyl-5-heptèn-2-one)⁹ ou le cancer de la peau.^{10,11}

Les articles décrivant l'oxydation du squalène sont principalement publiés par des universités américaines (Stanford) ou asiatiques, notamment japonaises. La Figure 3 fait mention de 10 exemples de sociétés dépositaires de brevets associant les mots-clés "oxidation" et "squalene" parmi les 243 sociétés et organisations référencées par Scifinder®.

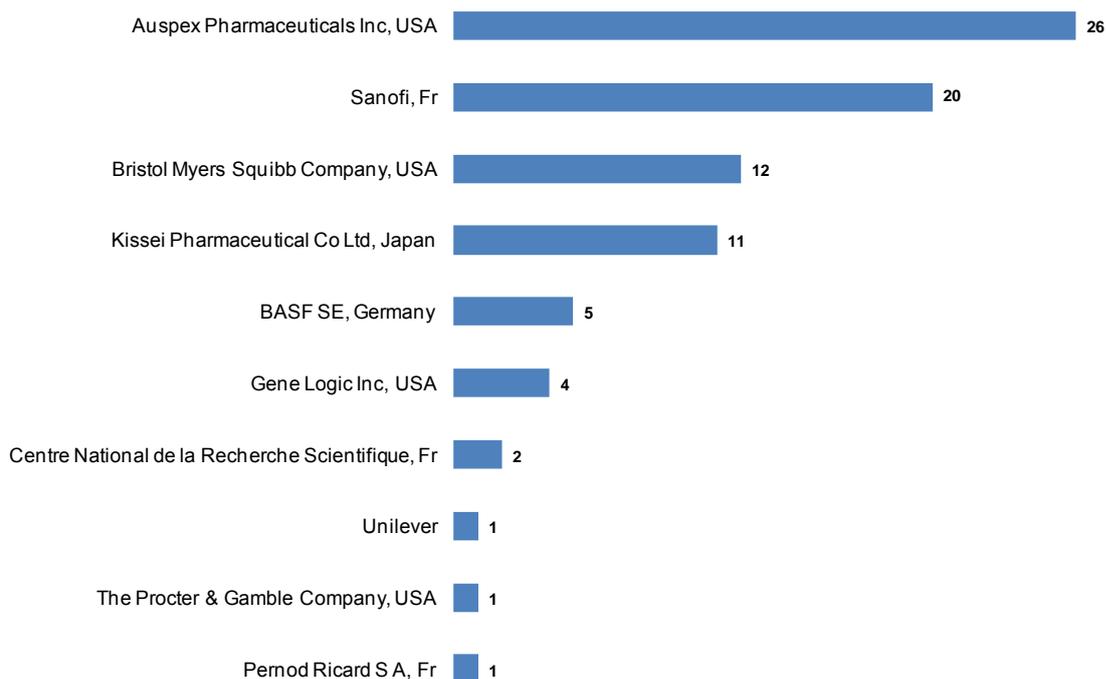


Figure 4. Sociétés et nombre de brevets déposés par chacune d'elles concernant l'oxydation du squalène, parmi les 243 référencées sur la base de données Scifinder®.

L'importance de l'oxydation du squalène dans les domaines pharmaceutique et biopharmaceutique ressort clairement ici puisque les trois entreprises ayant le plus grand nombre de brevets appartiennent à ce secteur d'activité. Parmi elles, deux entreprises sont américaines, *Auspex pharmaceuticals* et *Bristol Myers Squibb Company*, tandis que la France se positionne en deuxième place avec *Sanofi* et ses 20 brevets. Le brevet déposé par *Procter & Gamble* en 2010 protège les compositions de produits cosmétiques visant à réduire les signes visibles de l'âge sur la peau.¹² *Unilever* compte également un brevet, datant de 2008, concernant les cellules apoclines à l'origine de la sécrétion de fluides aqueux contenant des lipides et des acides aminés qui, exposés aux bactéries présentes à la surface de la peau, sont transformés en composés malodorants, contenant des stéroïdes et des acides gras à chaîne courte.¹³

Références :

1. S. Horii, *Stencil sheet*, **1928**, US1679034
2. M. Tsujimoto, An unsaturated hydrocarbon in shark liver oil. *Indian J. chem. Japan*, **1916**. 19, 277-281.
3. H. Scheyer, *Condensation products derived from "glyoxaldianthraquinone" compounds (brown vat dyes)*, **1935**, General Aniline Works . US1990841
4. D. L. Klass, R. W. Watson, *Oil additives*, **1963**, Standard Oil Co. Indiana . US3108958

-
5. S. Izeki, T. Imaki, T. Iida, *Perfuming material from squalene*, **1972**, Tokai Fishery Research Institute . JP47028961B4
 6. A. C. Chapman, Spinacene: its oxidation and decomposition. *J. Chem. Soc., Trans.* **1923**. 123, 769-779.
 7. E. Raymond, Autoxidation of benzaldehyde. III. Action of antioxygen compounds toward the autoxidation of benzaldehyde and applications. *J. Chim. Phys. PC*, **1931**. 28, 480-510.
 8. N. Kalogeropoulos, A. Chiou, M.S. Ioannou, V.T. Karathanos, Nutritional evaluation and health promoting activities of nuts and seeds cultivated in Greece. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **2013**. 64, 757-67.
 9. W. C. J. Weisel Clifford, K. Mohan, J. Vallarino, J. D. Spengler, Ozone and Ozone Byproducts in the Cabins of Commercial Aircraft. *Environ. Sci. Technol.*, **2013**, 47, 4711-4717.
 10. V. A. Kostyuk, A.I. Potapovich, D. Lulli, A. Stancato, C. De Luca, S. Pastore, L. Korkina, Modulation of human keratinocyte responses to solar UV by plant polyphenols as a basis for chemoprevention of non-melanoma skin cancers. *Cur. Med. Chem.*, **2013**. 20, 869-879.
 11. C. J. Paddon, P.J. Westfall, D.J. Pitera, K. Benjamin, K. Fisher, D. McPhee, M. D. Leavell, A. Tai, A. Main, D. Eng, D. R. Polichuk, K. H. Teoh, D. W. Reed, T. Treynor, J. Lenihan, M. Fleck, S. Bajad, G. Dang, D. Diola, G. Dorin, K. W. Ellens, S. Fickes, J. Galazzo, S.P. Gaucher, T. Geistlinger, R. Henry, M. Hepp, T. Horning, T. Iqbal, H. Jiang, L. Kizer, B. Lieu, D. Melis, N. Moss, R. Regentin, S. Secrest, H. Tsuruta, R. Vazquez, L. F. Westblade, L. Xu, M. Yu, Y. Zhang, L. Zhao, J. Lievense, P. S. Covello, J. D. Keasling, K. K. Reiling, N. S. Renninger, J. D. Newman, High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature (London, U. K.)*, **2013**. 496, 528-532.
 12. B. B. Jarrold, R. L. Binder, M. K. Robinson, L. T. Laughlin, K. M. Lammers, *Cosmetic compositions and methods for maintaining and improving barrier function of the stratum corneum and to reduce the visible signs of aging in skin*, **2011**, The Procter & Gamble Company, USA . US 20110262025A1
 13. J. S. Burry, R. L. Evans, M. Harker, G. T. E. Kealey, D. F. McDonald, *Apocrine cell line (ASG5) exhibiting long-term proliferation capability, and uses for screening diagnostic, therapeutic and cosmetic preparations*, **2008**, Unilever PLC, UK; Unilever N. V.; Hindustan Unilever Limited . WO2008116713A2

Degradative Oxidation of Squalene. Part 1. Stepwise Polyperoxidation of Squalene by Chemically and Photochemically Generated Singlet Oxygen $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$)

Delphine Blonde,^a Stéphanie Delbaere,^b Caroline Tokarski,^c Katherine Thompson,^d Craig Jones,^d Jean-Marie Aubry^a and Véronique Nardello-Rataj^{a*}

^a *Université Lille1 and ENSCL, EA 4478 Chimie Moléculaire et Formulation, Equipe Oxydation et Physicochimie de la Formulation, Bât. C6, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. E-mail: veronique.rataj@univ-lille1.fr*

^b *Université Lille Nord de France, CNRS UMR 8516, UDSL, Lille, F-59006 Lille Cedex, France*

^c *Miniaturisation pour l'Analyse, la Synthèse & la Protéomique (MSAP), USR CNRS 3290, Université Lille 1 Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

^d *Unilever PLC Port Sunlight Laboratory Bebington Wirral, CH63 3JW, United Kingdom*

Keywords: Squalene; Singlet oxygen; Dark singlet oxygenation, Photooxidation; Hydroperoxide; Sodium molybdate

Abstract

The stepwise hydroperoxidation of squalene (SQ) with singlet molecular oxygen, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), chemically generated from the catalytic hydrogen peroxide/sodium molybdate system has been investigated in methanol. TLC and HPLC monitoring combined with hydroperoxide titration showed that six families of hydroperoxides, $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ with $n = 1$ to 6, are formed. This finding was confirmed by électrospray ionization mass spectrometry (ESI-Qq-TOF) using lithium cationization. Depending on the amount of added H_2O_2 , the degree of peroxidation of SQ could be controlled and the squalene hydroperoxides $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ could thus be specifically prepared and isolated. NMR investigations provided some information on the chemical structure of the hydroperoxides in the complex mixtures. Comparison with photochemical singlet oxygenation of squalene in methanol, acetone and methylene chloride showed that both pathways proceed similarly for the production of hydroperoxides.

Introduction

2,6,10,15,19,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene is an ubiquitous natural triterpene commonly called squalene (SQ). It is found in large quantities in liver oil of deep-sea sharks and it is also present in common foodstuffs such as plant oils such as olive oil or palm oil. Some studies have demonstrated that squalene can play the role of antioxidant for fatty unsaturated (poly)acids by trapping peroxy radicals on the skin surface¹ or in olive oil where the stability of oxidation products

of squalene impede the propagation of the radical reaction.² In human body, it is an important intermediate in the biosynthesis of cholesterol, steroid hormones and vitamin D.³ Squalene is the main hydrocarbon of human surface lipids and the human sebum can contain up to 15% of SQ, besides triacylglycerol, esters and sterols.⁴ Recent studies have highlighted the chemo-preventive activity of squalene against some types of cancers.⁵ It is also currently used in cosmetics as an emollient and moisturizing agent and in pharmaceuticals as an immunologic adjuvant in vaccines.⁶ However, under UV exposure, it has been shown that SQ is the principal target lipid for peroxidation on the human skin surface through the formation of squalene monohydroperoxide isomers⁷ which play an important role in the pathology of acne^{8,9} sunburn,¹⁰ pityriasis versicolor¹¹ and skin aging.^{12,13}

Despite the ubiquity of squalene in day life, e.g. SQ oil is marketed and used as an agent that can protect the skin from harmful environmental factors, and its potential significance in toxicology, detail structural studies of squalene oxidation products are rather scarce in the literature because of the complexity of the generated mixtures. Actually, as this molecule bears six electron-rich double bonds, SQ is readily prone to oxidative degradation. This generally undesired process can result from autoxidation by molecular oxygen ($^3\text{O}_2$) involving the formation of radical oxygen species (ROS)¹⁴ or from singlet molecular oxygen, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), an efficient bielectronic oxidant which can form when oxygen, a photosensitizer (typically chlorophyll¹⁵) and light are combined.¹⁶ Both processes give rise to the formation of numerous hydroperoxides as primary oxidation products, abbreviated as **SQ(OOH)_n** where n indicates the number of perhydroxyl groups.¹⁷ In this context, it is important to understand the formation of hydroperoxides which can be responsible for contact allergy as many oxidation products derived from terpenes. Some of them such as limonene, a widely used fragrance molecule, are well-known to be readily oxidizable generating allergens besides unpleasant odours and/or undesired colors.¹⁸

The detection and the identification of the chemical structure of the SQ hydroperoxides in such complex mixtures is a real analytical challenge which requires the development of specific methods. Nakagawa *et al.*¹⁹ have developed an ion-trap tandem mass spectrometric method for the detection and the identification of the monohydroperoxide isomers, noted **SQ(OOH)₁**, formed during sunlight exposure of the human skin surface lipids. They have determined the chemical structure and the relative quantity of six monohydroperoxide isomers. Mountfort *et al.*²⁰ have investigated the sensitized photooxidation products of SQ generated in latent fingerprints. Squalene hydroperoxides ranging successively from monohydroperoxides **SQ(OOH)₁** to pentahydroperoxides **SQ(OOH)₅** along with SQ epoxide were isolated by semi-preparative HPLC and identified by direct infusion ESI-MS and flow injection APCI-MS.

In the present work, we report on an in-depth study of the hydroperoxides issued from the the dark singlet oxygenation of squalene with the hydrogen peroxide/sodium molybdate system in comparison with the photooxidation. Several methods have been developed to detect and identify the

hydroperoxides using complementary and adapted techniques such as HPLC, NMR and ESI-MS with lithium cationisation. The stepwise polyperoxidation of squalene until the hexahydroperoxide isomers is shown whatever the way of singlet oxygenation generation, i.e. chemically or photochemically.

Material and Methods

Chemicals. Squalene (> 98%), rose Bengal sodium salt (> 90%), tetraphenylporphyrin (99%), sodium molybdate (99%) and methylene chloride (> 99.8%) were purchased from Sigma-Aldrich. Hydrogen peroxide (50 wt.%) was from Prolabo. Acetone (99.5 %) was obtained from Verbiere and methanol (> 99.8%) from SDS. Solvents were of HPLC grade. In all experiments, ultra-pure water of Millipore (resistivity 18.2 M Ω .cm) was used.

NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a gradient-field TXI probe (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C). 20 mg of sample was soluted into 600 μL of CDCl_3 .

High-Performance Liquid Chromatography with UV-Detection. HPLC-UV instrument consisted of a Shimadzu LC-20 AT equipped with C18 column (250 mm, 4.6 mm, 5 μm) and a UV detector (UVSPD20A) ordered at 210 and 240 nm. The eluent was a gradient acetonitrile/water mixture from 50:50 to 100:0 v/v at 1 mL/min for 25 minutes and of 100:0 v/v until 60 minutes.

Thin-Layer Chromatography (TLC). TLC analysis was carried out on silica gel plates of aluminum (ALUGRAM SIL G/UV 254) with hexane/diethyl ether/acetic acid (85/15/2 and 25/75/2 (v/v)) as mobile phases. They were visualized with aqueous solutions of Cu_2SO_4 and H_2SO_4 (10%) and heating with a heating-gun (see supporting information **S1**).

Titration of hydroperoxides. The concentration of hydroperoxides formed during the reaction was determined by a indirect titration of iodine adapted from the French standard AFNOR NFT 60-220. 1 mL sample solution was added to 12.5 mL of chloroform/acetic acid (2/3 v/v) under stirring. 0.5 mL of saturated KI solution (14.3 g/10 mL water) was added and aged for 5 min in a dark environment. The reaction was stopped by adding 37.5 mL water and the titration was performed by a $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution. All solutions were degassed with argon before use (see supporting information **S2**).

Nano ESI-Qq-TOF MS analysis of hydroperoxides. The MS spectra were obtained using Q-star Pulsar mass spectrometer (Perseptive biosystems, Framingham, MA, USA.). The samples containing squalene hydroperoxides (100 fmol/ μl) in methanol were cationized using lithium chloride solution (0.02% final).²¹ Detection was carried out in positive mode with a potential of 900 V applied on the needle. Spectra calibration was performed using native squalene ionized with lithium ($m/z = 417.407$ corresponding to the second peak of the isotopic pattern) and squalene hydroperoxides in function of the mass range obtained on the spectra (e.g. $m/z = 449.397$ for the squalene monohydroperoxide).

Photooxidation of squalene. Photooxidation of squalene (SQ) was carried out in a 1 cm cell irradiated by Philips Master SON-PIA 250 W sodium lamp. The lamp was held 5 cm vertically above the glass cell. A solution of SQ was prepared (0.03 M) in methanol, acetone or methylene chloride containing 10^{-5} M rose Bengal or 10^{-4} M tetraphenylporphyrin as sensitizers. A stream of oxygen was continuously bubbled into the reaction medium. Temperature was stabilized at 5 ± 0.1 °C with a thermoregulated water-bath. The reaction was monitored simultaneously by HPLC and TLC. After photooxidation, 0.1% (w/w) of black carbon was added under stirring overnight to remove rose Bengal. Filtration through silica gel of the reaction medium gave an uncolored solution leading to pure squalene hydroperoxides $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ after removing the solvent.

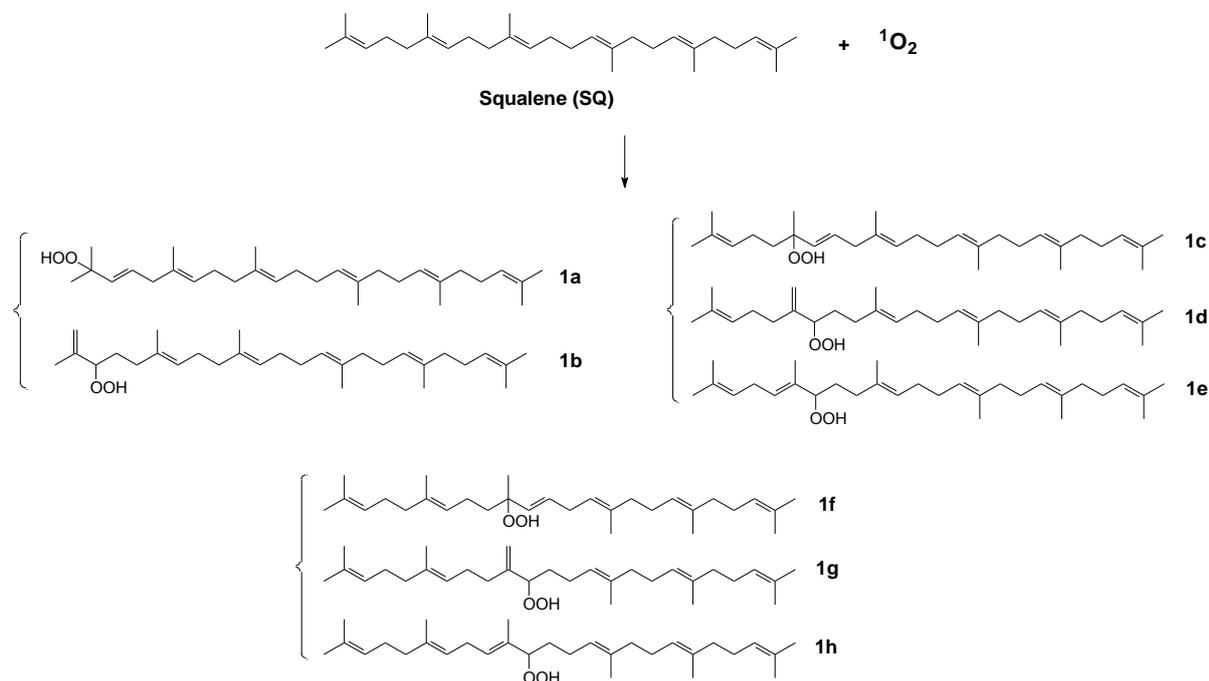
Dark singlet oxidation of squalene. Chemical oxidation of squalene (SQ) was performed with the hydrogen peroxide/sodium molybdate system in methanol.²² A solution containing 3.10^{-2} M SQ and 5.10^{-2} M sodium molybdate was placed at 20 °C. Hydrogen peroxide (50 wt.%) was added by batch of 60 μL (0.2 M) after each discoloration of the orange-red solution indicating the formation of peroxomolybdate intermediates. The reaction was simultaneously monitored by HPLC and TLC. After H_2O_2 consumption, sodium molybdate precipitated and methanol was removed under reduced pressure. Traces of methanol and sodium molybdate could be removed from the squalene hydroperoxides by extraction of hydroperoxides with methylene chloride (10 mL) and collected after solvent evaporation.

Results and Discussion

Autoxidation of terpenes and unsaturated fatty acids of fats and oils is generally an unwanted process, especially in the fragrance, cosmetic and food industries. Such a degradation pathway occurs quite readily leading mainly to the formation of hydroperoxides as primary oxidation products. Although this oxidative degradation process is mainly due to the presence of oxygen $^3\text{O}_2$ and involves radical oxygenated species (ROS), it has also been suggested that singlet molecular oxygen, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), a bielectronic and powerful oxidant, might also be involved because of its ability to directly react with such electron-rich compounds.²³ It is however noteworthy that hydroperoxides produced from singlet oxygen can be different from those generated by autoxidation. Indeed, lipid hydroperoxides formed by $^3\text{O}_2$ are conjugated dienes whereas those produced by $^1\text{O}_2$ are both conjugated and non-conjugated dienes. In addition, in contrast to the radical autoxidation process, the hydroperoxides resulting from the singlet oxygen pathway can be obtained in a controlled way. However, hydroperoxides are generally frail molecules prone to decompose thermally through radical pathways generating secondary oxidation products.²⁴ In 1949, Bolland and Hughes studied the autoxidation of squalene at 55 °C; they reported that for each oxidized molecule, two oxygen molecules were consumed and suggested the formation of a diperoxide in four steps.²⁵ Later, it was shown that its autoxidation results mainly in the formation of secondary and tertiary alcohols, besides some epoxide.^{26,27} Finally, contrary

to conjugated dienes which can give rise to polymerization from the early stage in their oxidation and to dienes with one methylene group interrupted double bonds which provide hydroperoxides initially and polymerize at an advance stage of oxidation, dienes with two methylene interrupted double bonds such as squalene, mainly lead to hydroperoxides whose decomposition is associated to carbon-carbon bond scission (see Part 2).¹⁷

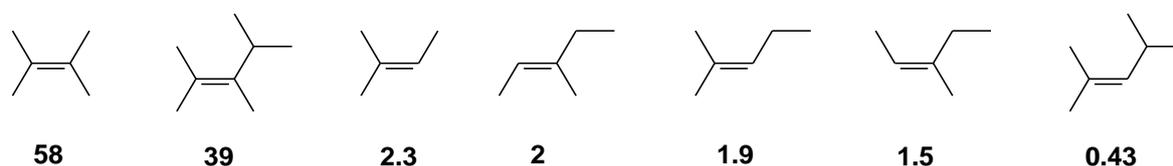
Squalene readily interacts with singlet oxygen both chemically and physically.^{28,29-31} An overall rate constant k equal to $3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and to $4.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ has been determined by Tanielan *et al.*³¹ in methanol at 253 K and in ethanol at 298 K by Fujita *et al.*^{29b} respectively. As it bears six electron-rich non-conjugated double bonds, squalene reacts with $^1\text{O}_2$ according to the ene reaction and a stepwise hydroperoxidation is expected giving a complex mixture of numerous hydroperoxides, abbreviated as $\text{SQ}(\text{OOH})_n$, where $n \geq 1$ represents the degree of SQ peroxidation, i.e. the number of hydroperoxyl functions on the squalene moiety. As shown in Scheme 1, eight monohydroperoxides $\text{SQ}(\text{OOH})_1$ can result from the reaction of SQ with $^1\text{O}_2$ in the early stage of the peroxidation. However, each of these products can then further react with $^1\text{O}_2$ leading to several further peroxidized squalene $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ ($n > 1$). Moreover, once it has reacted, the squalene molecule has lost its symmetry which further increases the number of possible compounds.



Scheme 1. Chemical structures of the eight monohydroperoxide isomers, $\text{SQ}(\text{OOH})_1$, which can be formed during the early stage of the reaction between squalene and singlet molecular oxygen.

Each monohydroperoxide isomer still bears six double bonds which can further react with singlet oxygen. However, depending on their chemical structure, i.e. methyl substitution degree of the remaining double bonds, conjugation or not, hydroperoxyl function in α -position, each of the

SQ(OOH)₁ will react kinetically differently with ¹O₂. Moreover, the eight monohydroperoxides have lost the symmetry of the squalene molecule increasing the number of possible further peroxidized SQ. We can notice that in isomers **1a**, **1b**, **1c**, **1d**, **1f** and **1g** the ene reaction of SQ with one molecule of ¹O₂ creates disubstituted double bonds in the SQ skeleton, which are less reactive than trisubstituted ones (Scheme 2).³² Moreover, these disubstituted double bonds have a hydroperoxyl function in α-position which makes them further less reactive. So we can assume that for these isomers, only five double bonds will continue to react further with ¹O₂ in a similar way as squalene itself. On the contrary, in the case of isomers **1e** and **1h**, the reaction with ¹O₂ has generated a trisubstituted double bond with only one methylene group between the two double bonds. These double bonds are expected to have a noticeable reactivity towards ¹O₂ even if they also bear a hydroperoxyl function in α-position. At this stage of the polyperoxidation process of SQ, no conjugated double bonds have been formed what it is likely to occur for some **SQ(OOH)₂** isomers.

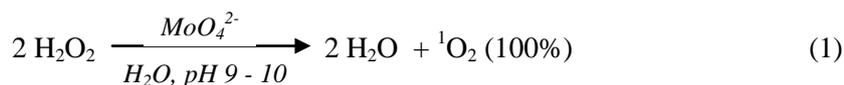


Scheme 2. Relative rate constants of olefin with singlet oxygen from ref 32. ($k \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^{+1} \text{ s}^{-1}$).

To our knowledge, no detailed study dealing with the detection and the identification of the different squalene hydroperoxides formed during the reaction of SQ with ¹O₂ has been reported before. Nakano et al. reported the formation of the mono- **SQ(OOH)₁**, the di- **SQ(OOH)₂** and the tri- **SQ(OOH)₃** hydroperoxides resulting from the reaction of SQ with ¹O₂ released from the thermal decomposition at 37 °C of a naphthalene endoperoxide derivative, i.e. 3-(4'-methyl-1'-naphthyl)-propionic acid, 1'4'-endoperoxide abbreviated as NEPO.³³ The proportions of the three isomers were dependent on the amount of NEPO. Most of other reported studies deal with the involvement of ¹O₂ in the squalene oxidation on the skin surface, favored by the presence of various endogenous photosensitizers such as thiophene derivatives,²⁹ chlorpromazine,³⁴ psoralen and derivatives,³⁵ griseofulvin³⁶ or coproporphyrin,³⁷ thus demonstrating the participation of ¹O₂ in the skin photosensitized oxidation of squalene under UV exposure. Kohno et al. have shown that under these conditions, the monohydroperoxide isomers **SQ(OOH)₁** are the main oxidation products.³⁰

1. Dark singlet oxygenation of SQ with ¹O₂ chemically generated from the hydrogen peroxide/sodium molybdate system

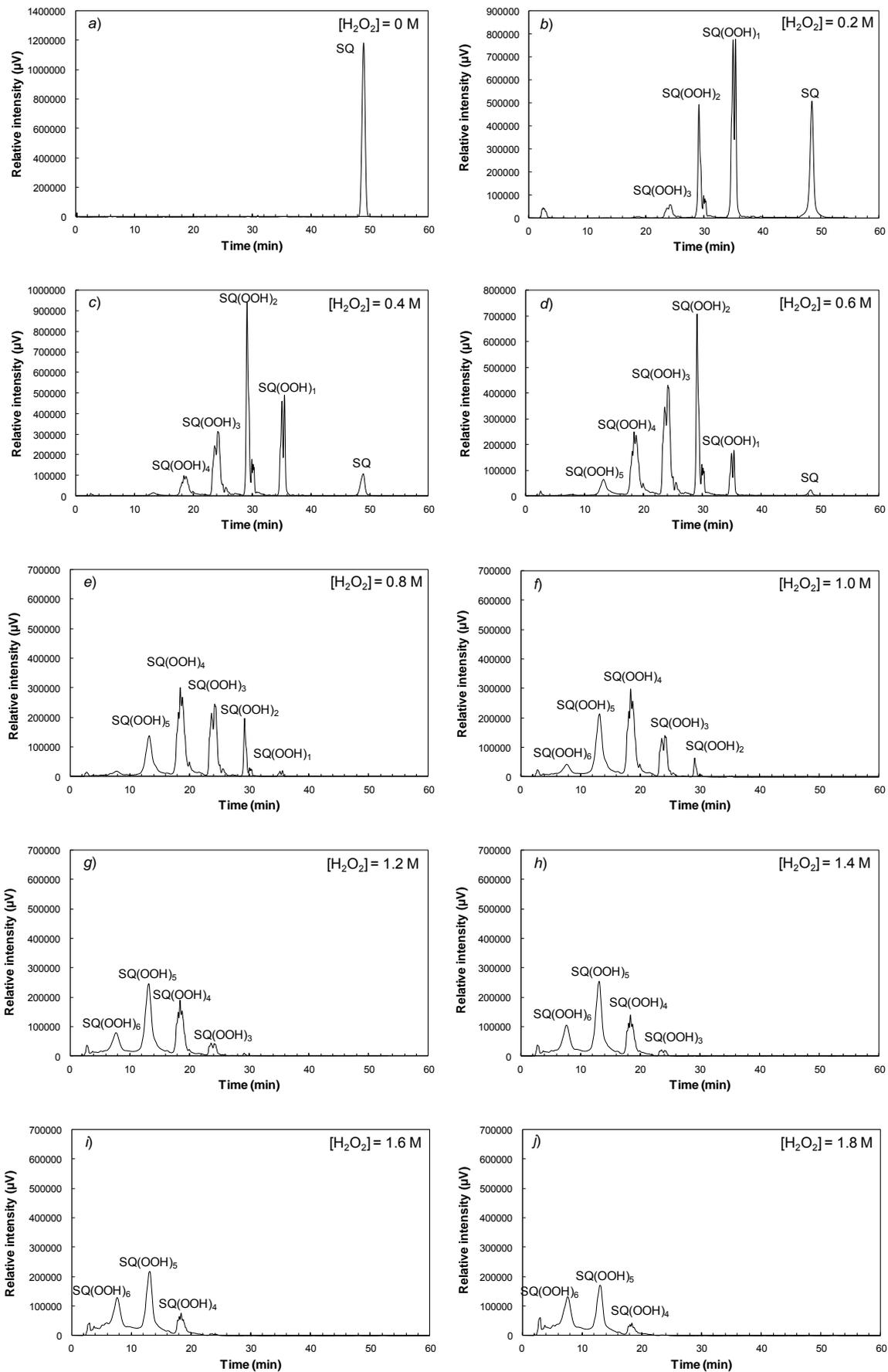
The hydrogen peroxide/molybdate ion system constitutes a simple and very efficient method to generate chemically and catalytically high flux of singlet oxygen. Actually, MoO₄²⁻ ions are able to disproportionate H₂O₂ quantitatively in alkaline water at room temperature (Eq. 1):³⁸



This reaction also proceeds efficiently in polar and protic solvents like methanol.^{22c} In that case, in order to avoid too long reaction times, the amount of added H_2O_2 must be controlled. Indeed, the interaction of molybdate anions with hydrogen peroxide leads to the formation of four peroxomolybdate intermediates, $\text{MoO}_{4-n}(\text{O}_2)_n^{2-}$ with $n = 1$ to 4, which are in equilibrium. It has been shown that the triperoxomolybdate $\text{MoO}(\text{O}_2)_3^{2-}$ is the main precursor of ${}^1\text{O}_2$.^{22a} Hence, in order to optimize the kinetics of the reaction, this intermediate needs to be favored what is achieved by adding H_2O_2 in several batches, otherwise an excess of H_2O_2 would favor the tetraperoxomolybdate, $\text{Mo}(\text{O}_2)_4^{2-}$, which is much more stable and which does not generate ${}^1\text{O}_2$. The process is very simple to implement and is industrially applied to the peroxidation of β -citronellol for the production of rose oxide.³⁹ Moreover, the course of the reaction can be followed visually as the precursor of ${}^1\text{O}_2$ is soluble in MeOH and gives an orange-red solution which turns down to a white precipitate of molybdate when the added H_2O_2 has been decomposed, i.e. after ≈ 30 min, indicating that a new batch can be added. This method exhibits several advantages over the photooxidation: 1) it does not require the use of a sensitizer, 2) the catalyst is recovered by simple and spontaneous precipitation in MeOH, 3) the amount of ${}^1\text{O}_2$ generated is well known as it depends on the amount of added H_2O_2 , knowing that the ${}^1\text{O}_2$ yield in MeOH is equal to 80% and 4) this method allows the preparation of higher amounts of products than by photooxidation under safer conditions.

Thereby the dark singlet oxygenation of squalene ($3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) by the $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$ system was carried out in methanol. Complete conversion of SQ is reached with 0.7 mol L^{-1} of H_2O_2 , which corresponds to ≈ 23 equiv. compared to molybdate. However, the reaction, which was simultaneously followed by TLC, HPLC and hydroperoxide titration, was continued until a cumulative H_2O_2 concentration of 2 mol L^{-1} was added as the monohydroperoxides formed in the early stage of the process still bear electron-rich double bonds which can further react with ${}^1\text{O}_2$. Thanks to TLC and HPLC analyses, the successive formation of several hydroperoxides could be readily detected during the reaction. Monitoring of the reaction by TLC using two eluents of different polarity clearly showed 8 distinct spots (see supporting information **S1**). The less polar mobile phase allowed the separation of $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ from $n = 1$ to 4 while the more polar mobile phase enabled to distinguish four other compounds.

On the other hand, HPLC analyses of the reaction media showed the successive appearance of 6 different groups of peaks at shorter and shorter retention times, corresponding to more and more polar compounds. Figure 1 shows the evolution of the HPLC chromatograms as a function of H_2O_2 concentration.



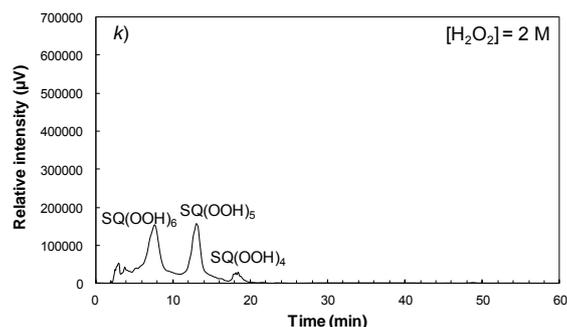


Figure 1. HPLC chromatograms as a function of $[H_2O_2]$ during the dark singlet oxygenation of squalene (SQ) in methanol. Conditions: $[SQ] = 3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[MoO_4^{2-}] = 5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

To confirm the identification of each squalene hydroperoxide peaks, the solution is recovered at the exit of the HPLC column and solution have been analyzed by ESI-MS. Thus, we have precisely attributed each peaks of HPLC chromatogram with $SQ(OOH)_n$. The different peak groups can be logically assigned to the hydroperoxide isomers, $SQ(OOH)_1$ to $SQ(OOH)_6$. It is noteworthy that the peaks of $SQ(OOH)_1$ to $SQ(OOH)_4$ correspond to several isomers which are not well separated under our HPLC conditions. Figure 2 reports the evolution of the relative percentage of the hydroperoxides $SQ(OOH)_n$ from $n = 1$ to 6 detected by HPLC. At the wavelength of detection, i.e. $\lambda = 210 \text{ nm}$, we can consider that the different hydroperoxides have a similar extinction coefficient.

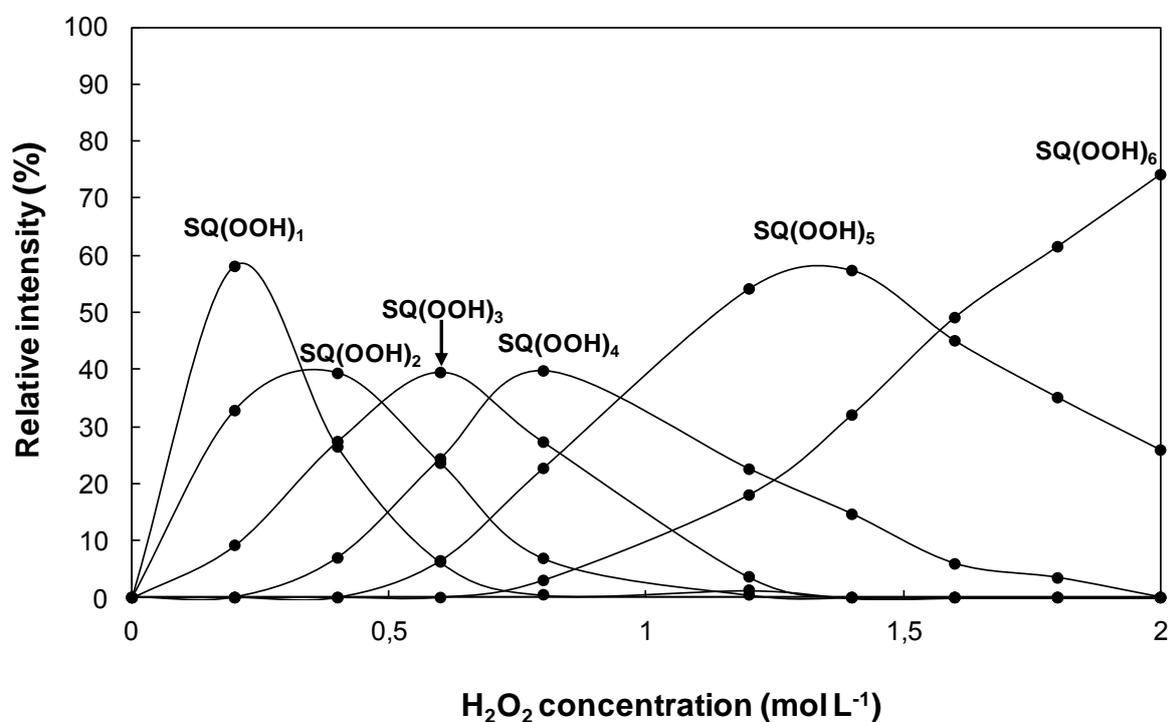
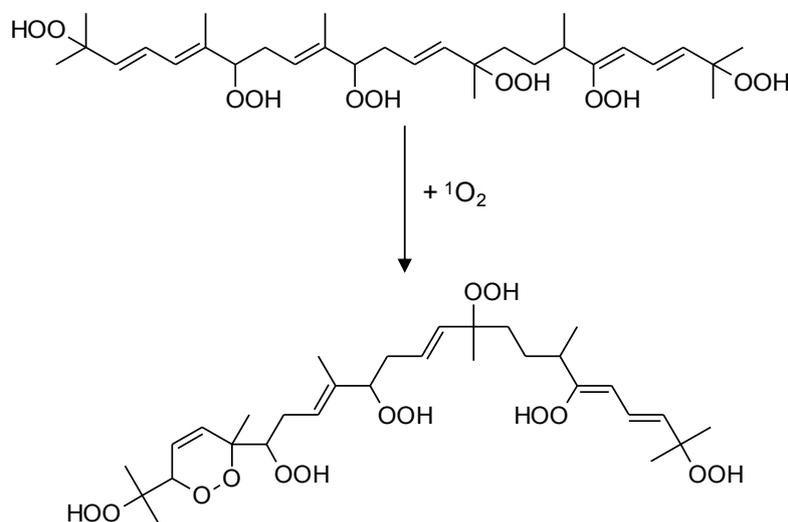


Figure 2. Evolution as a function of H_2O_2 concentration of the relative intensities of HPLC peaks of the squalene hydroperoxides $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ detected during the dark singlet oxygenation of squalene (SQ) in methanol. Conditions: $[\text{SQ}] = 3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{MoO}_4^{2-}] = 5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Figure 2 clearly shows the stepwise polyperoxidation of SQ as H_2O_2 is added. We can first notice that, as soon as H_2O_2 is added, $\text{SQ}(\text{OOH})_1$ to $\text{SQ}(\text{OOH})_3$ are formed simultaneously suggesting that reactivity of the mono- $\text{SQ}(\text{OOH})_1$ and the di-hydroperoxides $\text{SQ}(\text{OOH})_2$ with $^1\text{O}_2$ is competitive with that of squalene itself. Then, as the reaction proceeds, higher peroxidized SQs appear while the less peroxidized ones start disappearing. It is noteworthy that $\text{SQ}(\text{OOH})_1$ is major ($\approx 60\%$) at $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.2 \text{ mol L}^{-1}$ and that $\text{SQ}(\text{OOH})_2$, $\text{SQ}(\text{OOH})_3$ and $\text{SQ}(\text{OOH})_4$ are successively major at the same rate ($\approx 39\%$) at $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.4, 0.6$ and 0.8 mol L^{-1} respectively. This finding suggests that they kinetically react similarly with $^1\text{O}_2$. When the number of available double bonds starts decreasing, $\text{SQ}(\text{OOH})_5$ isomers are formed reaching $\approx 54\%$ at $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1.2 \text{ mol L}^{-1}$. Finally, the most peroxidized species, $\text{SQ}(\text{OOH})_6$, start being formed from $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.6 \text{ mol L}^{-1}$ and reach a maximum at 2 mol L^{-1} . At this concentration, only $\text{SQ}(\text{OOH})_5$ and $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ are present in the reaction medium in a 25/75 ratio.

Although TLC analyses carried out during the reaction showed the formation of eight compounds, it is highly probable that only 6 of them correspond to the hydroperoxide isomers $\text{SQ}(\text{OOH})_{1-6}$ and that the other detected oxidation products result from a $[4 + 2]$ $^1\text{O}_2$ cycloaddition as depicted on Scheme 3.



Scheme 3. Example of chemical structures which can be obtained by a $[4 + 2]$ cycloaddition of singlet oxygen on the hexahydroperoxide isomers $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ bearing conjugated double bonds.

This hypothesis is supported by hydroperoxide titration (see supporting information **S2**) during the reaction which indicates a progressive increase of the hydroperoxidation confirming the formation of more and more peroxidized squalene $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ but also exhibiting a plateau from $[\text{H}_2\text{O}_2] = 2 \text{ mol L}^{-1}$ which corresponds to a total hydroperoxyl function concentration equal to 0.135 mol L^{-1} .

2. Comparison with the sensitized photooxidation of squalene (SQ)

More conventionally, singlet oxygen can also be efficiently produced photochemically in the presence of oxygen, light and a sensitizer as already reported.¹⁶ In order to compare the photochemical and the chemical singlet oxygen routes, SQ was photooxidized at 5 °C with a sodium lamp in methanol in the presence of rose Bengal under oxygen bubbling. The photooxidation was also conducted in acetone and methylene chloride in the presence of TPP, an efficient type II sensitizer. The reaction, which was carried out for 3h, was monitored by TLC and HPLC analyses. It proceeds efficiently since after only ≈ 30 min, almost all the starting SQ was consumed whatever the solvent. Under these conditions, $^1\text{O}_2$ reacts with SQ providing the expected hydroperoxides $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ with $n = 1$ to 6. The photooxidation proceeds faster in methylene chloride as after 5 min, only 8% of squalene remained compared to 30% in acetone and 42% in methanol. This is accounted for by the longer lifetime of $^1\text{O}_2$ in the chlorinated solvent.⁴⁰ Figure 3 reports the evolution of the HPLC peak relative intensities as a function of irradiation time in methylene chloride.

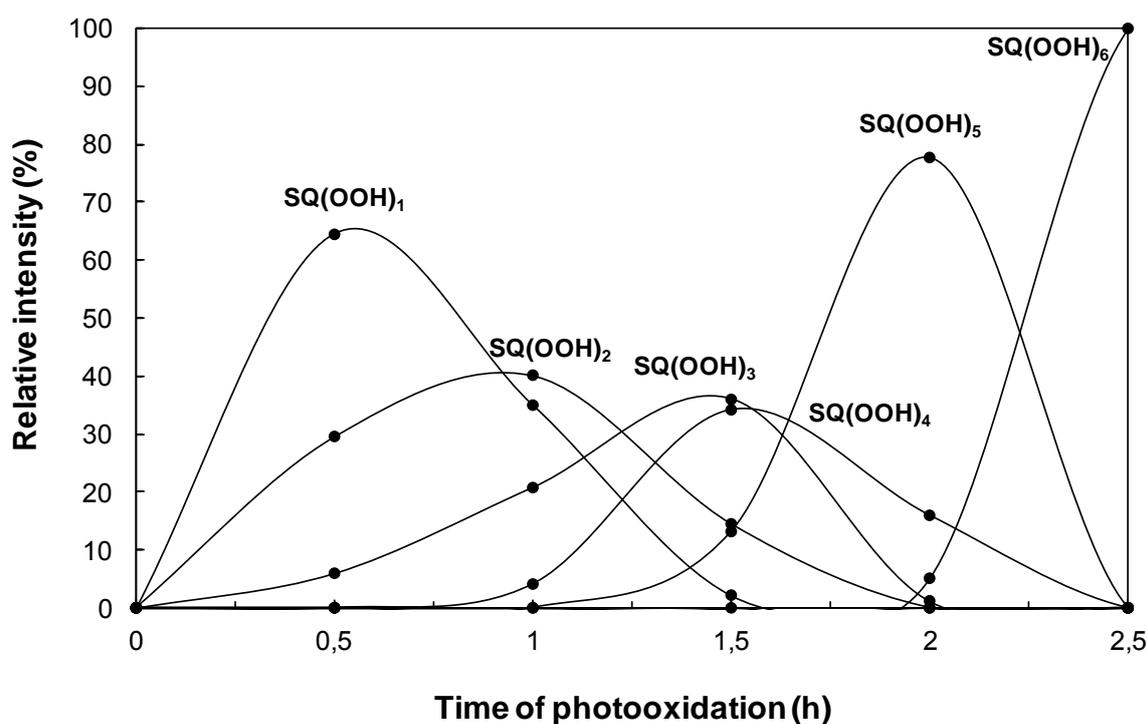


Figure 3. Stepwise polyperoxidation of squalene during its photooxidation in methylene chloride: relative intensities of HPLC peaks of the squalene hydroperoxides $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ as a function of irradiation time. Conditions: $[\text{SQ}] = 3 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{TPP}] = 3 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $T = 5 \text{ }^\circ\text{C}$.

It is noteworthy that the profile of hydroperoxide formation during SQ photooxidation is roughly similar to that obtained for SQ dark singlet oxygenation. The different $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ with $n = 1$ to 6 appear progressively with the time of photooxidation. Here again, as soon as the photooxidation has started, $\text{SQ}(\text{OOH})_1$ to $\text{SQ}(\text{OOH})_3$ are formed simultaneously. Then, as the photooxidation proceeds,

higher peroxidized SQs appear while the less peroxidized ones start disappearing. Depending on the irradiation time, the major hydroperoxides are successively **SQ(OOH)₁** ($\approx 65\%$) at $t = 0.5$ min, **SQ(OOH)₂** ($\approx 40\%$) at $t = 1$ h, **SQ(OOH)₃** and **SQ(OOH)₄** (≈ 36 and 34% respectively) at $t = 1.5$ h, **SQ(OOH)₅** ($\approx 80\%$) at $t = 2$ h and finally, **SQ(OOH)₆** (more than 90%) at $t = 2.5$ h. Roughly speaking, the relative proportions of the hydroperoxide isomers are similar to that obtained with $^1\text{O}_2$ chemically generated. The evolution of the hydroperoxide formation resulting from SQ photooxidation in methanol and acetone is shown in supporting information **S4** and **S5**. In all cases, the mono-, the di- and the trihydroperoxide isomers are formed as soon as the photooxidation starts. However, depending on the solvent, the formation of the hydroperoxide isomers as a function of irradiation time exhibits some discrepancies which can be, in part, linked to the singlet oxygen lifetime in the different solvents: $\tau_{\text{acetone}} = 5.1 \times 10^{-5}$ s, $\tau_{\text{methanol}} = 7.0 \times 10^{-6}$ s and $\tau_{\text{CH}_2\text{Cl}_2} = 9.1 \times 10^{-5}$ s.⁴⁰ The main difference lies in the different reactivity of the **SQ(OOH)_n** with $^1\text{O}_2$. It is also interesting to note that **SQ(OOH)₆** appears at very different times according to the solvent: 1.8h, 0.5h and 0.1h in CH_2Cl_2 , MeOH and acetone respectively. Table 1 indicates the maximum relative proportion obtained for each SQ hydroperoxide isomers **SQ(OOH)_n** with $n = 1$ to 6 and time of irradiation corresponding to this maximum.

Table 1. Relative proportions (%) and time of irradiation at which the different **SQ(OOH)_n** predominates in the stepwise polyperoxidation of SQ. Conditions: $[\text{SQ}] = 3 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹, $[\text{sensitizer}] = 3 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, $T = 5$ °C. Time of irradiation is indicated into brackets in hour.

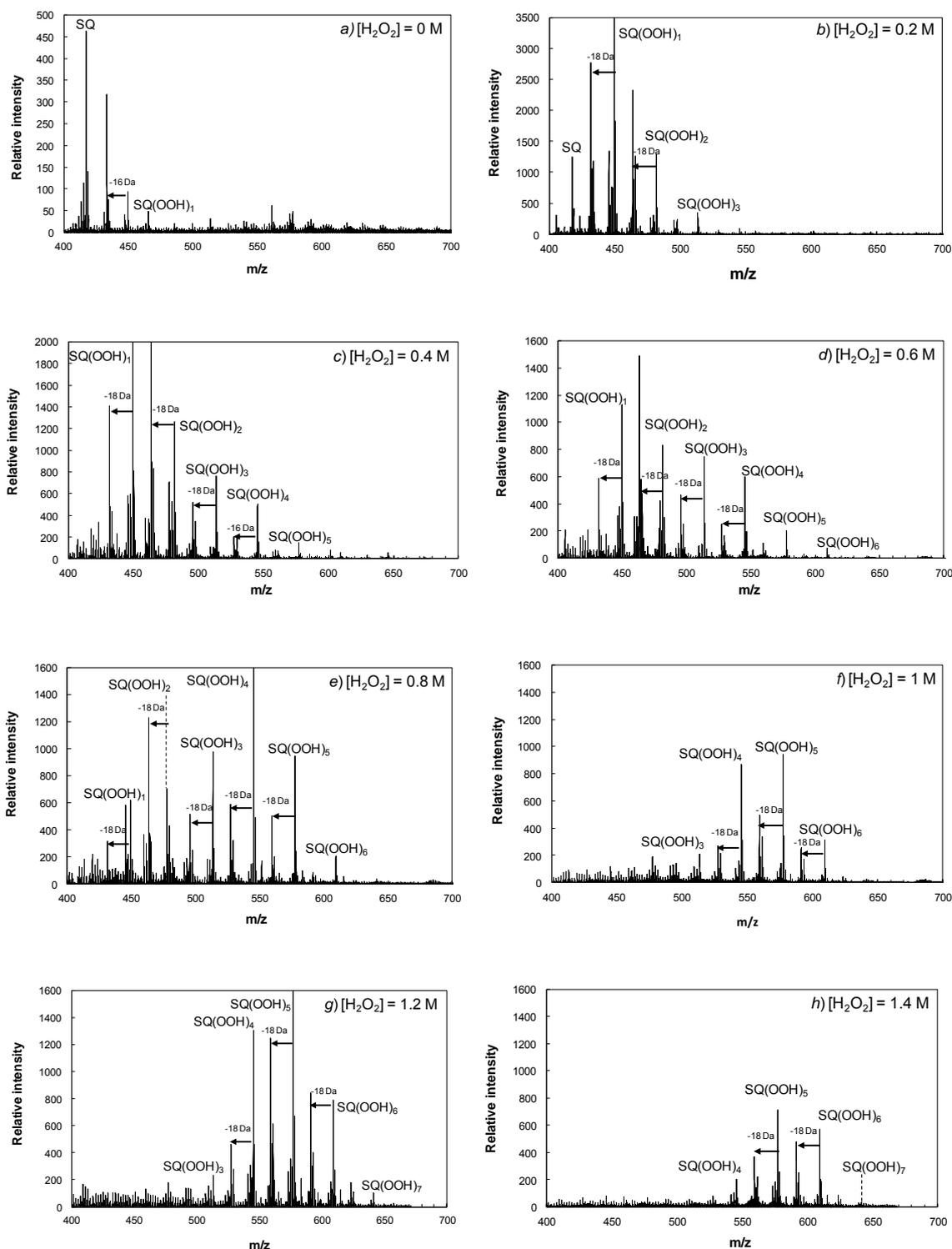
n	Relative percentage (time of irradiation in hour)		
	CH ₂ Cl ₂	MeOH	Acetone
1	65 (0.5)	40 (0.1)	40 (0.1)
2	40 (1)	25 (0.25)	26 (0.1)
3	36 (1.5)	25 (0.5)	10 (0.25)
4	34 (1.5)	32 (0.75)	28 (0.5)
5	78 (2)	43 (1)	44 (0.5)
6	100 (2.5)	75 (2.5)	95 (2.5)

3. Detection and identification of the squalene hydroperoxides **SQ(OOH)_n** by ESI-MS-Li⁺

Direct detection of hydroperoxides is tricky because of their thermal lability and constitutes a real analytical challenge, especially when they are in complex mixture. Indeed, even if GC/MS is often a method of choice, it often requires derivatization. On the other hand, TLC and HPLC are convenient methods for the detection of the products, provided that good separation can be obtained, but they do not provide useful information regarding the chemical structure. In order to confirm the nature of the different hydroperoxides detected by TLC and HPLC as a function of H_2O_2 concentration during the dark singlet oxygenation of SQ, the reaction media were simultaneously analyzed by ESI-MS-Li⁺

mass spectroscopy. The ESI-MS technique is particularly appropriate to the analysis of thermo-sensitive and low-molecular-weight products.⁴¹

In the present work, cationization of squalene hydroperoxides with lithium was used in order to notably improve the sensitivity of their detection.²¹ Figure 4 reports the evolution of the mass spectra obtained as a function of H₂O₂ addition.



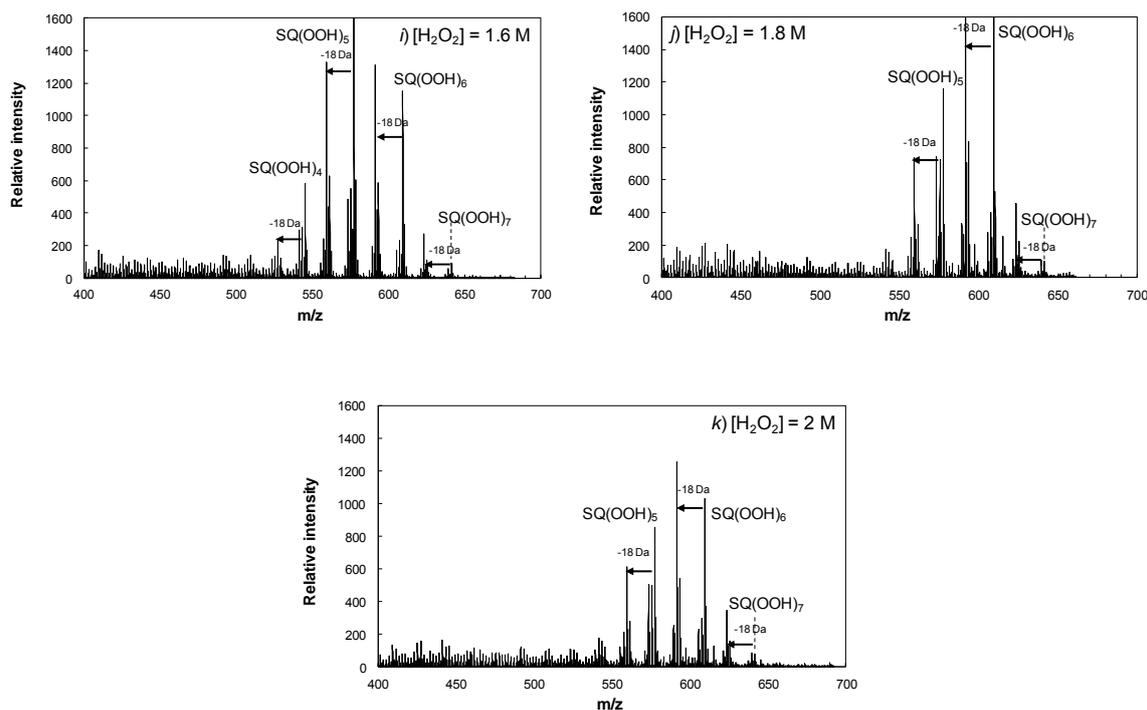
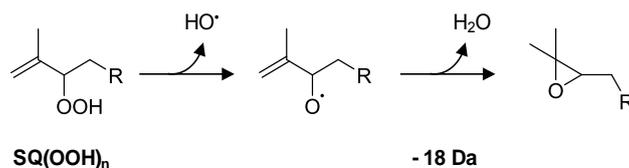


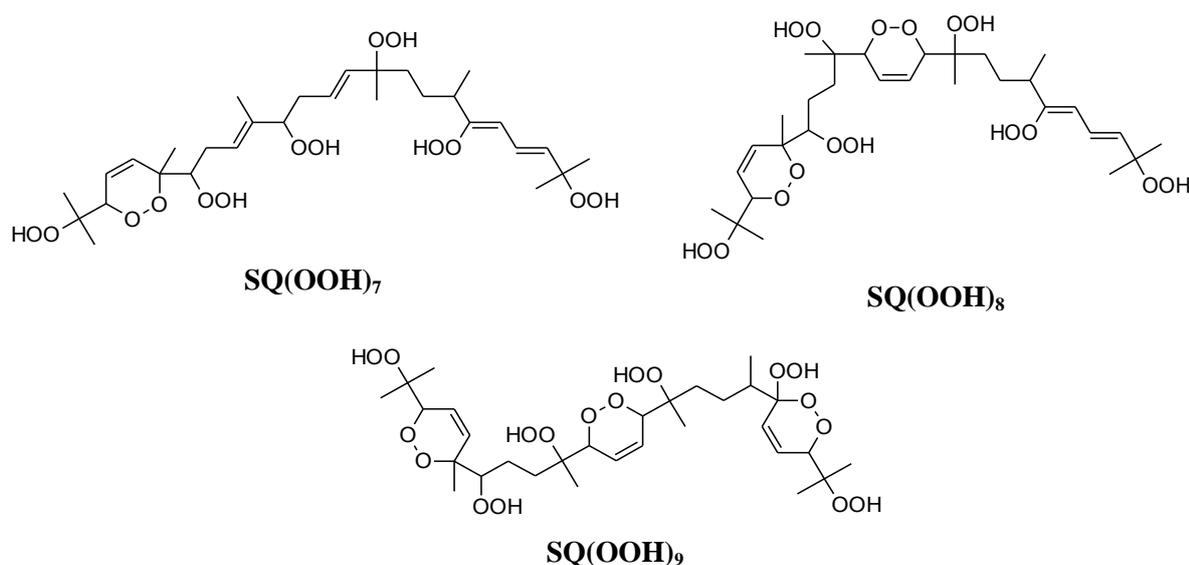
Figure 4. Evolution of the nanoESI-Qq-TOF MS spectra of squalene hydroperoxides detected during the dark singlet oxygenation of squalene (SQ) in methanol. Conditions: [SQ] = 3×10^{-2} mol L⁻¹, [MoO₄²⁻] = 5×10^{-2} mol L⁻¹, T = 25 °C.

This technique allows the detection of the different hydroperoxide isomers **SQ(OOH)_n** with n ranging from 1 to 6 as the concentration of added H₂O₂ increases: **SQ(OOH)₁** (m/z 449), **SQ(OOH)₂** (m/z 481), **SQ(OOH)₃** (m/z 513), **SQ(OOH)₄** (m/z 545), **SQ(OOH)₅** (m/z 577) and **SQ(OOH)₆** at m/z 609. This is in good agreement with the HPLC results both in terms of peroxidation degree assignment and relative proportions. The mass spectrometry experiments unambiguously confirm the formation of the hexahydroperoxide isomers **SQ(OOH)₆** as observed by TLC and HPLC, while until now, the highest hydroperoxidized squalene reported in the literature was the pentahydroperoxide **SQ(OOH)₅**.²⁰ Some other peaks are also present on the spectra. The first one is the peak at m/z 433 assigned to SQ(O) which also appears on the spectrum of squalene. This peak corresponds probably to the epoxide which has already been reported in the literature and which results from an autoxidation process.²⁰ The other peaks correspond to a loss of mass equal to 18 compared to the hydroperoxide **SQ(OOH)_n** suggesting a loss of a water molecule which provides the corresponding epoxides. This reaction probably occurs during the mass spectrometry analysis as these compounds have not been detected by the other techniques.



Scheme 4. Dehydration of allylic hydroperoxides accounting for a loss of weight of 18 during the ESI-MS analysis.

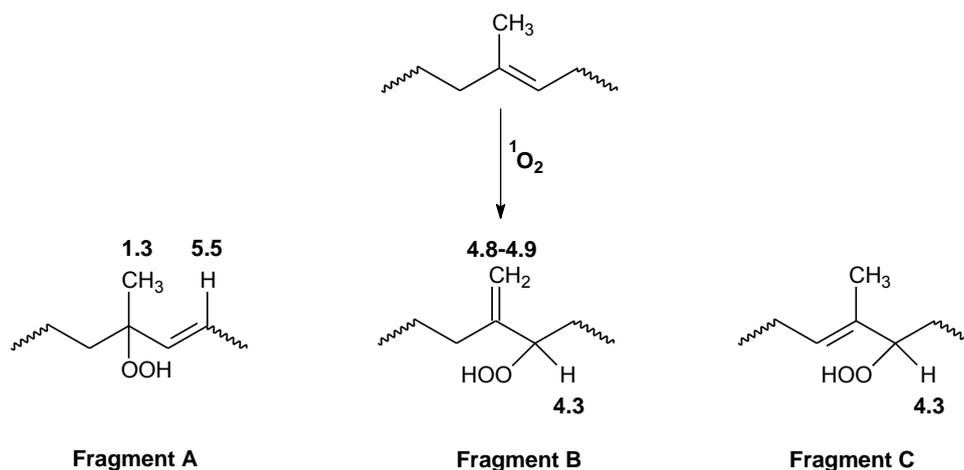
Similar results were obtained with photooxidized SQ. After 30 min, the hexahydroperoxide SQ(OOH)_6 at m/z 609 appears and increases with the irradiation time becoming the major hydroperoxide even after 10 h of irradiation. Higher peroxidized squalenes, which probably do not correspond to hydroperoxides, were observed at $m/z = 641$, $m/z = 673$, $m/z = 705$ and $m/z = 737$ (see supporting information S6. Comparison of the ESI-MS spectra obtained with the two other solvents shows that at $\Delta t = 3$ h in methanol, almost only SQ(OOH)_6 isomers are present besides SQ(OOH)_5 and small amounts of SQ(OOH)_7 whereas at $\Delta t = 10$ h, the relative intensities are quite similar but with some SQ(OOH)_8 and SQ(OOH)_9 . In acetone, SQ(OOH)_6 is still major but the hydroperoxides seem to be less stable as several other peaks appear.



Scheme 5. Example of possible chemical structures for SQ(OOH)_n with $n > 6$.

4. Structural analysis of the polyperoxides by ^1H and ^{13}C NMR

Finally, in order to go deeper in the information related to the chemical structure of the hydroperoxides, NMR analyses were carried out. Though the reaction of SQ with $^1\text{O}_2$ according to the ene reaction lead to numerous possible hydroperoxide isomer structures, there are three ways for hydrogen abstraction resulting in allylic secondary (fragments B and C) and tertiary (fragment A) hydroperoxides as depicted in Scheme 6.



Scheme 6. Squalene hydroperoxide fragments observed detected by ^1H NMR. Chemical shifts (in ppm) of characteristic protons are indicated (detailed into supporting information S3).

It is noteworthy that for terminal double bonds, B and C consist in the same hydroperoxide. The sample containing mainly the $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ was analyzed by NMR spectroscopy (see supporting information, Figure S3). In spite of overlapping parts rendering the spectrum intricate, it was possible to observe the characteristic protons of each of the three fragments (A, B and C, Scheme 3). Their relative proportions were estimated from peak integrations. The following relative proportion was obtained: 50% of fragment A, 30% of fragment B and 20% of fragment C. It is noteworthy that a same molar ratio for secondary and tertiary hydroperoxides is obtained, in agreement with the result reported by Nakagawa *et al.* for the $\text{SQ}(\text{OOH})_1$ hydroperoxides.¹⁹

Conclusion

This work is an in-depth investigation of the singlet oxygenation of squalene which leads to a complex mixture of hydroperoxide isomers $\text{SQ}(\text{OOH})_n$. Dark singlet oxidation of SQ by the hydrogen peroxide/sodium molybdate system in methanol is shown to be a very convenient method for the efficient peroxidation squalene in a controlled way. It gives rise to the formation of six groups of hydroperoxide isomers $\text{SQ}(\text{OOH})_1$ to 6 which appear successively with addition of H_2O_2 . Similar behaviors are obtained when SQ is photooxidized in methanol, dichloromethane or acetone during 3h while SQ itself has been completely consumed after only 0.5h. At the end of all the reactions, the hexahydroperoxide isomers $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ are the major compounds besides little amounts of $\text{SQ}(\text{OOH})_5$.

The NMR study of the hydroperoxides shows that the complex mixture of hydroperoxides contains 50% of fragments with tertiary hydroperoxides and 50% of fragments with secondary hydroperoxides. HPLC analyses allowed the separation of the six families of hydroperoxides in agreement with the number of squalene unsaturations. On the other hand, TLC using two eluents of different polarity has revealed eight spots but it is likely that two of them correspond to cyclic peroxide isomers resulting

from the reaction of $^1\text{O}_2$ with conjugated double bonds present on the hexahydroperoxide isomers. This assumption was supported by hydroperoxide titration but also by ESI-MS experiments which revealed peaks at molecular weights higher than that of $\text{SQ}(\text{OOH})_6$, notably $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ with $n = 7$ to 10. The ESI-MS technique combined with lithium cationization was indeed found particularly well-suited for the detection of thermo-sensitive hydroperoxide enhancing considerably the sensitivity and selectivity of the detection. In conclusion, squalene reacts efficiently with singlet oxygen according to the ene reaction and to a stepwise polyperoxidation providing a complex mixture of hydroperoxides, which could then be decomposed into volatiles molecules, as reported in Part 2.

References

- 1) M. A. Dessì, M. Deiana, B. W. Day, A. Rosa, S. Banni, F. P. Corongiu, Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids: effect of squalene. *Eur. J. Lipid Sci. Tech*, **2002**, *104*(8), 506-512.
- 2) E. Psomiadou, M. Tsimidou, Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *J. Agr. Food Chem.* **2002**, *50*(4), 716-721.
- 3) R. G. Langdon, K. Bloch, The utilization of squalene in the biosynthesis of cholesterol. *J. Biol. Chem.* **1953**, *200*, 135-144.
- 4) a) D. T. Downing, J. S. Synthesis and composition of surface lipids of human skin. *J. Invest. Dermatol.* **1974**, *62*, 228-244. b) P. Ramasastry, D. T. Downing, P. E. Pochi, J. S. Strauss. Chemical composition of human skin surface lipids from birth to puberty. *J. Invest. Dermatol.* **1970**, *54*, 139-144.
- 5) a) J. T. Smith, Squalene, potential chemopreventive agent. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **2000**, *9*(8), 1841-1848. b) H. L. Newmark. Squalene, Olive Oil, and Cancer Risk: Review and Hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *889*, 193-203.
- 6) Z-R. Huang, Y-K. Lin, J-Y. Fang, Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology. *Molecules*, **2009**, *14*, 540-554.
- 7) S. M. Mudiyansele, M. H. P. Elsner, J. J. Thiele, Ultraviolet A induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *120*, 915-922.
- 8) a) D. Saint-Leger, A. B., E. Cohen, M. Chivot, A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. I. In vitro study of squalene oxidation. *Br. J. Dermatol.* **1986**, *114*, 535-542.

-
- 9) D. Saint-Leger, A. B. E. Lefebvre, E. Cohen, M. Chivot, A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. II. In vivo study of squalene oxides in skin surface and intra-comedonal lipids of acne patients. *Br. J. Dermatol.* **1986**, *114*, 543-552.
 - 10) K. J. Dennis, T. S., Production of malonaldehyde from squalene, a major skin surface lipid, during UV-irradiation. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 711-716.
 - 11) M. Nazzaro-Poro, S. P., M. Picardo, R. Mercantini, A. Breathnach, Lipoxygenase activity of *Pityrosporum* in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **1986**, *87*, 108-112.
 - 12) K. Chiba, T. S. K. Kawakami, M. Onoue, Skin roughness and wrinkle formation induced by repeated application of squalenemonohydroperoxide to the hairless mouse. *Exp. Dermatol.* **1999**, *8*, 471-479.
 - 13) K. Chiba, K. Y. I. Makino, K. Kawakami, Comedogenicity of squalene monohydroperoxide in the skin after topical application. *J. Toxicol. Sci.* **2000**, *25*, 77-83.
 - 14) a) Y-Z, Fang, S. Yang, G. Wu, Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **2002**, *18*, 872-879. b) B. C. Dickinson, C. J. Chang, Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7(8)*, 504-511.
 - 15) E. N. Frankel, Methods to determine extent of oxidation. In *Lipid Oxidation*; E. N. Frankel, E. N., Ed.; The oily Press: Glasgow, U.K., 1988; pp 79-98.
 - 16) a) A. A. Frimer, *Singlet Oxygen*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1985; Vols. I-IV. b) B. Ranby, J. F. Rabek, *Singlet Oxygen*; J. Wiley and Sons: New York, 1975. c) H. H. Wasserman, R. W. Murray, *Singlet Oxygen*; Academic Press: New York, 1979; Vol. 40. d) A. Greer, Christopher Foote's Discovery of the role of singlet oxygen [$^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$)] in photosensitized oxidation reactions, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39(11)*, 797-804.
 - 17) a) E. H. Farmer, D. A. Sutton, The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Part II. Hydroperoxidic structure and chain scission in low molecular polyisoprenes. *J. Chem. Soc.* 1942, 139-148. b) G. Scott, Peroxides. In *Atmospheric oxidation and antioxidants*; Scott, G., Ed.; Elsevier Publishing Co.: Amsterdam, 1965; Chapter 2, p 16.
 - 18) a) J. B. Christensson, P. Forsström, A.M. Wennberg, A. T. Karlberg, M. Matura, Air oxidation increases skin irritation from fragrance terpenes. *Contact Dermatitis*, **2009**, *60*, 32-40. b) A. T. Karlberg, M. A. Bergström, A. Börje, K. Luthman, J. Lars, G. Nilsson, Allergic Contact Dermatitis - Formation, Structural Requirements, and Reactivity of Skin Sensitizers. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 53-69. c) J. Elberling, A. Linneberg, H. Mosbech, A. Dirksen, T. Menné, N. H.
-

- Nielsen, F. Madsen, L. Frølund, J. Duus Johansen, Airborne chemicals cause respiratory symptoms in individuals with contact allergy. *Contact Dermatitis*, **2005**, 52(2), 65-72. d) X. Baur, E. M. Schneider, D. Wieners, A. B. Czuppon, Occupational asthma to perfume. *Allergy*, **1999**, 54(12), 1334-1335.
- 19) K. Nakagawa, D. I. Y. Suzuki, S. Yamashita, O. Higuchi, S. Oikawa, T. Miyazawa, Ion-trap tandem mass spectrometric analysis of squalene monohydroperoxide isomers in sunlight-exposed human skin. *J. Lipid. Res.* **2007**, 48, 2779-2787.
- 20) K. A. Mountfort, H. B. N. Archer, S. M. Jickells, Identification of Oxidation Products of Squalene in Solution and in Latent Fingerprints by ESI-MS and LC/APCI-MS. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 2650-2657.
- 21) N. Garnier, C. Rolando, J. Munk Høtje, C. Tokarski, Analysis of archaeological triacylglycerols by high resolution nanoESI, FT-ICR MS and IRMPD MS/MS: Application to 5th century BC–4th century AD oil lamps from Olbia (Ukraine). *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, 284, 47-56.
- 22) a) V. Nardello, J. Marko, G. Vermeersch, J-M. Aubry, ⁹⁵Mo NMR and kinetic studies of peroxomolybdic intermediates involved in the catalytic disproportionation of hydrogen peroxide by molybdate ions. *Inorg. Chem.* **1995**, 34(20), 4950-4957. b) V. Nardello, S. Bouttemy, J-M. Aubry, Olefin oxidation by the system H₂O₂/MoO₄²⁻: competition between epoxidation and peroxidation. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1997**, 117, 439-447. c) V. Nardello, J-M. Aubry, T. Linker, Oxidation of Chiral 1,4-Cyclohexadienes: A Comparison of Chemically and Photochemically Generated Singlet Oxygen ¹O₂ (¹Δ_g). *Photochem. Photobiol.* **1999**, 70(4), 524-530. d) V. Nardello, M. Hervé, P. Alsters, J-M. Aubry, "Dark" Singlet Oxygenation of Hydrophobic Substrates in Environmentally Friendly Microemulsions. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, 344(2), 184-191. e) V. Nardello, S. Bogaert, P. L. Alsters, J-M. Aubry, Singlet oxygen generation from H₂O₂/MoO₄²⁻: peroxidation of hydrophobic substrates in pure organic solvents. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 8731-8734.
- 23) D. B. Min, H. O. Lee, in R. Teranishi, E. L. Wick, and I. Hornstein, eds., Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, pp. 175-187.
- 24) a) K. M. Shaich, Lipid oxidation: theoretical aspect, Bailey's industrial oil and Fat products, 2005. b) E. N. Frankel, E. W. Neff, E. Selka, Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: VII. Volatile thermal decomposition products of pure hydroperoxydes from autoxidized and photosensitized oxidized methyl oleate, linoleate and linolenate, lipids, *16*(5), 279-285. c) G. Procida, A. C. D. Compagnone, R. M. Maggio, L. Cerretani, M. D. Carlo,

- Influence of chemical composition of olive oil on the development of volatile compounds during frying. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *230*, 217-229.
- 25) J-L. Bolland, H. Hughes, Primary thermal oxidation product of squalene. *J. Chem. Soc.* **1949**, 492-497.
- 26) A. Mouzdahir, S. Bakkas, J-F. Ronani, Aerobic and anaerobic abiotic oxidation of squalene in the presence of hydroperoxides. *Chemosphere*, **2001**, *44*, 771-777.
- 27) E. Choe, D. B. Min, Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol 5, 2006, 169-186.
- 28) A. Ryu, K. Arakane, C. Koide, H. Arai, T. Nagano, Squalene as a Target Molecule in Skin Hyperpigmentation Caused by Singlet Oxygen. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32(9)*, 1504-1509.
- 29) a) M. Sasaki, K. Tokiwa, H. Mori, T. Sakata, H. Fujita, Peroxidation of model lipids in the presence of thiophene derivatives with UV-A light. *Photomed. Photobiol.*, 1990, *12*, 177-178. b) H. Fujita, K. Tokiwa, K. Sayama, H. Mori, M. Sasaki, Mechanistic Study of the photooxidation of squalene sensitized with 2,2':5',2-terthiophene and 2,2'-bithiophene. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 2960-2964.
- 30) a) Y. Kohno, Y. E. S. Itho, S. Nagaoka, M. Takahashi, K. Mukai, Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochem. Biophys. Acta*, **1995**, *1256*, 52-56. b) Y. Kohno, O. Sakamoto, T. Nakamura, T. Miyazawa, Determination of human skin surface lipid peroxides by chemiluminescence-HPLC. II. Detection of squalene hydroperoxide. *Yakagaku*. **1993**, *42*, 204-249.
- 31) C. Tanielian, J. Chaineaux, Photosensitized oxygenation of oligoisoprenes. *J. Photochem.* **1983**, *21*, 265-273.
- 32) B. M. Monroe, Rates of Reaction of Singlet Oxygen with Olefins, *J. Phys. Chem.* **1978**, *82(1)*, 15-18.
- 33) M. Nakano, Y. Kambayashi, H. Tatsuzawa, T. Komiyama, K. Fujimori, Useful $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) generator, 3-(4'-methyl-1'-naphthyl)-propionic acid, 1',4'-endoperoxide (NEPO), for dioxygenation of squalene (a skin surface lipid) in an organic solvent and bacterial killing in aqueous medium. *FEBS Letter*, **1998**, *432*, 9-12.
- 34) H. Fujita, I. Matsuo, M. Okazaki, K. Yoshino, M. Ohkido, Chlorpromazine-sensitized photooxidation of squalene. *Arch. dermatol. Res.* **1986**, *278*, 224-227.

- 35) I. Matsuo, K. Yoshino, M. Ohkido, Mechanism of skin surface lipid peroxidation. *Curr. Probl. Dermatol.* **1983**, *11*, 135-143.
- 36) I. Matsuo, N. Inukai, H. Fujita, M. Ohkido, Possible involvement of oxidation of lipids in inducing griseofulvin photosensitivity. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **1990**, *7*, 213-217
- 37) a) K. Arakane, A. Ryu, C. Hayashi, T. Masunaga, K. Shinmoto, S. Mashiko, T. Nagano, M. Hirobe, Singlet Oxygen ($^1\Delta_g$) Generation from Coproporphyrin in *Propionibacterium acnes* on Irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *223*, 578-582. b) A. Ryu, K. Arakane, C. Koide, H. Arai, T. Nagano, Squalene as a Target Molecule in Skin Hyperpigmentation Caused by Singlet Oxygen. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32(9)*, 1504-1509.
- 38) a) J. M. Aubry, Search for singlet oxygen in the decomposition of hydrogen peroxide by mineral compounds in aqueous solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 1985, *107*, 5844-5849. b) J. M. Aubry, B. Cazin, Chemical sources of singlet oxygen. 2. Quantitative generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions, *Inorg. Chem.* 1988, *27(12)*, 2013-2014.
- 39) a) P. L. Alsters, W. Jary, V. Nardello-Rataj, J-M. Aubry, Dark singlet oxygenation of β -citronellol: a key-step in the manufacture of rose oxide. *Org. Process Research & Development*, **2010**, *14*, 259-262. b) V. Nardello, M. Hervé, P. Alsters, J-M. Aubry, Dark singlet oxygenation of hydrophobic substrates in environmentally friendly microemulsions. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344(2)*, 184-191.
- 40) F. Wilkinson, J.G. Brummer, Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1981**, *10*, 809-999.
- 41) J. Nilsson, J. Carlberg, P. Abrahamsson, G. Hulthe, B.-A. Persson, A.-T. Karlberg, Evaluation of ionization techniques for mass spectrometric detection of contact allergenic hydroperoxides formed by autoxidation of fragrance terpenes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 3593-3598.

Supporting Information

Degradative Oxidation of Squalene. Part 1. Stepwise Polyperoxidation of Squalene by Chemically and Photochemically Generated Singlet Oxygen $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$)

Delphine Blonde,^a Stéphanie Delbaere,^b Caroline Tokarski,^c Katherine Thompson,^d Craig Jones,^d Jean-Marie Aubry^a and Véronique Nardello-Rataj^{a*}

^a *Université Lille Nord de France, Université Lille 1 and ENSCL, EA 4478 Chimie Moléculaire et Formulation, Equipe Oxydation et Physicochimie de la Formulation, Bât. C6, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. E-mail: veronique.rataj@univ-lille1.fr*

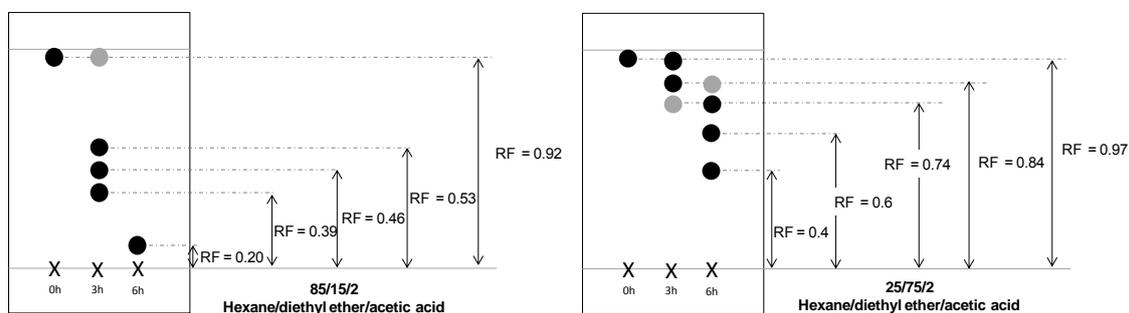
^b *Université Lille Nord de France, CNRS UMR 8516, UDSL, Lille, F-59006 Lille Cedex, France*

^c *Miniaturisation pour l'Analyse, la Synthèse & la Protéomique (MSAP), USR CNRS 3290, Université Lille 1 Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

^d *Unilever PLC Port Sunlight Laboratory Bebington Wirral, CH63 3JW, United Kingdom*

Thin-layer chromatography (TLC)	S1
Titration of SQ hydroperoxides	S2
NMR analysis of SQ hydroperoxides	S3
Photooxidation of SQ in acetone	S4
Photooxidation of SQ in methanol	S5
NanoESI-Qq-TOF MS spectra of squalene hydroperoxides	S6

S1: Thin-layer chromatography (TLC)



Scheme S1. Thin-layer chromatography of the hydroperoxides of squalene produced by photooxidation. Elution with 2 eluents at 0, 3h and 6h of irradiation.

Table S1. Assignment of the different spots observed by TLC to the squalene hydroperoxide $SQ(OOH)_n$.

Eluent 1: hexane/diethyl ether/acetic acid (85/15/2 v/v/v)		Eluent 2: hexane/diethyl ether/acetic acid (25/75/2 v/v/v)	
Hydroperoxide family	RF	Hydroperoxide family	RF
SQ	0.92	$SQ(OOH)_{0\text{ to }4}$	0.97
$SQ(OOH)_1$	0.53	$SQ(OOH)_5$	0.84
$SQ(OOH)_2$	0.46	$SQ(OOH)_6$	0.74
$SQ(OOH)_3$	0.39	$SQ(OOH)_7$	0.6
$SQ(OOH)_4$	0.20	$SQ(OOH)_8$	0.4
$SQ(OOH)_5$	0.07	-	-
$SQ(OOH)_6$	0	-	-

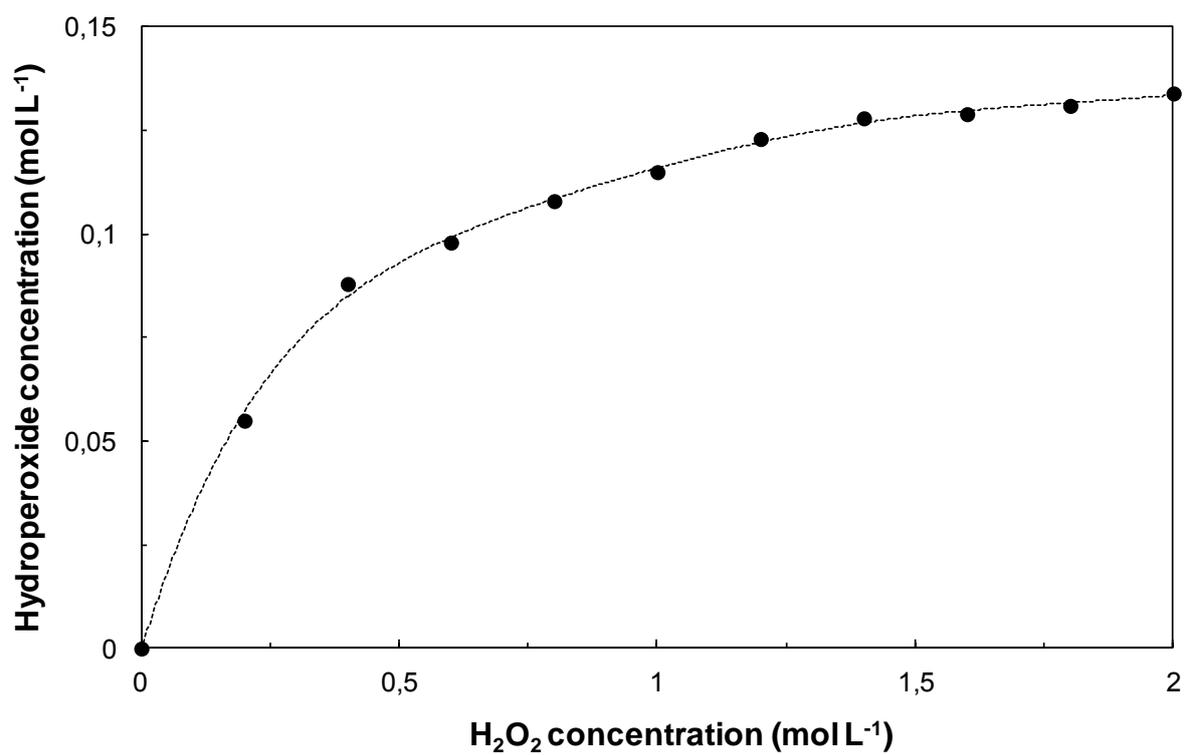
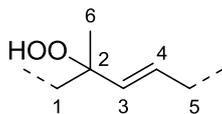
S2: Titration of SQ hydroperoxides

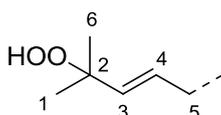
Figure S2. Titration of the squalene hydroperoxides as a function of H₂O₂ concentration during the dark singlet oxygenation of squalene.

S3: NMR analysis of SQ hydroperoxides

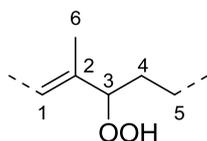


^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 5.68\text{-}5.52$ (m, 2H, H_3 and H_4); 1.33 (bs, 3H, H_6)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 137.6$ (CH, C_3); 130 (CH, C_4); 84 (C, C_2)

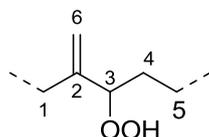


^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 135.5$ (CH, C_3); 126.7 (CH, C_4); 82 (C, C_2)



^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 5.21\text{-}5.06$ (m, 1H, H_1); 4.43-4.25 (m, 1H, H_3); 1.62 (m, 2H, H_4); 1.59 (bs, 3H, H_6)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 143$ (C, C_2); 122 (CH, C_1); 89.3 (CH, C_3)



^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 5.04\text{-}4.98$ (m, 2H, H_6); 4.43-4.25 (m, 1H, H_3); 1.62 (m, 2H, H_4)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): $\delta = 147$ (C, C_2), 113 (CH_2 , C_6); 89.3 (CH, C_3)

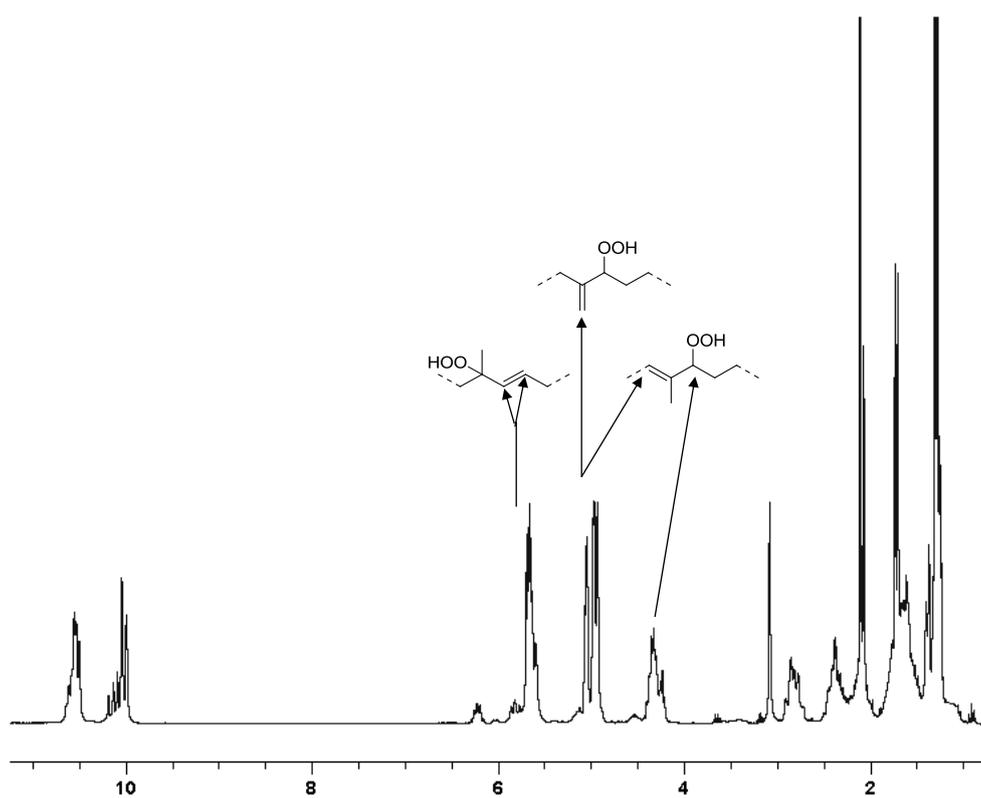


Figure S3.1. ^1H NMR spectrum of $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ in CD_3OD .

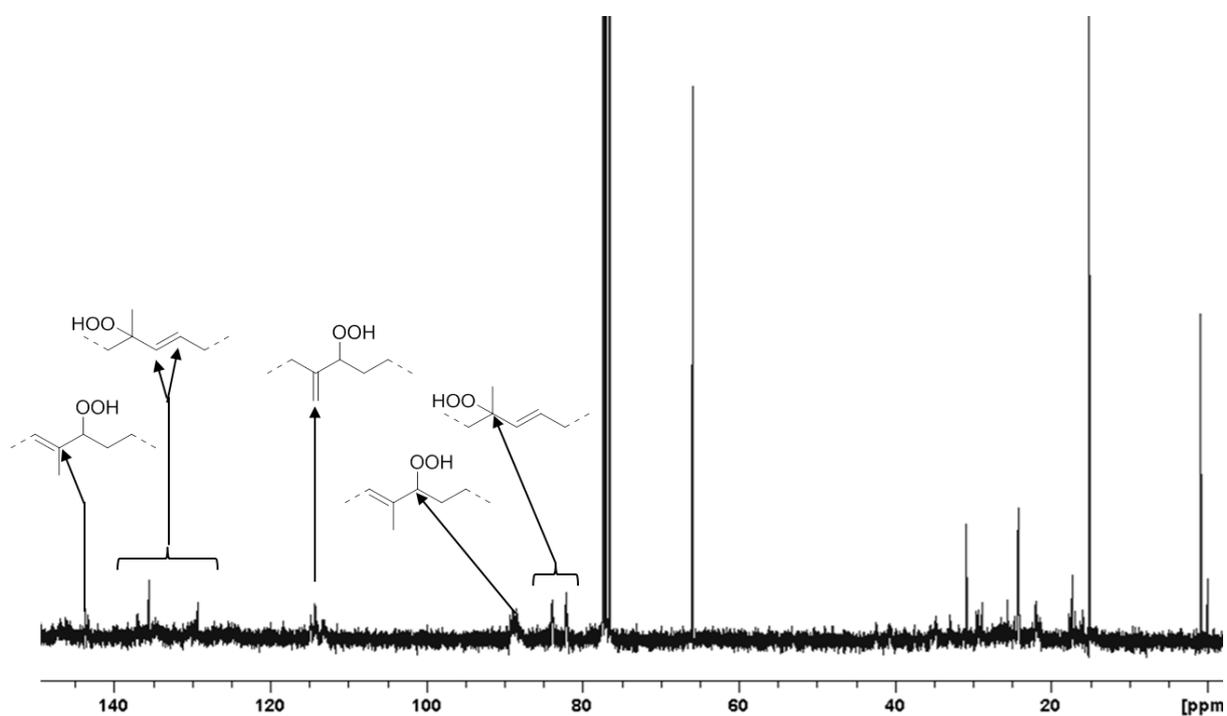


Figure S3.2. ^{13}C NMR spectrum of $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ in CDCl_3 .

S4: Photooxidation of SQ in acetone

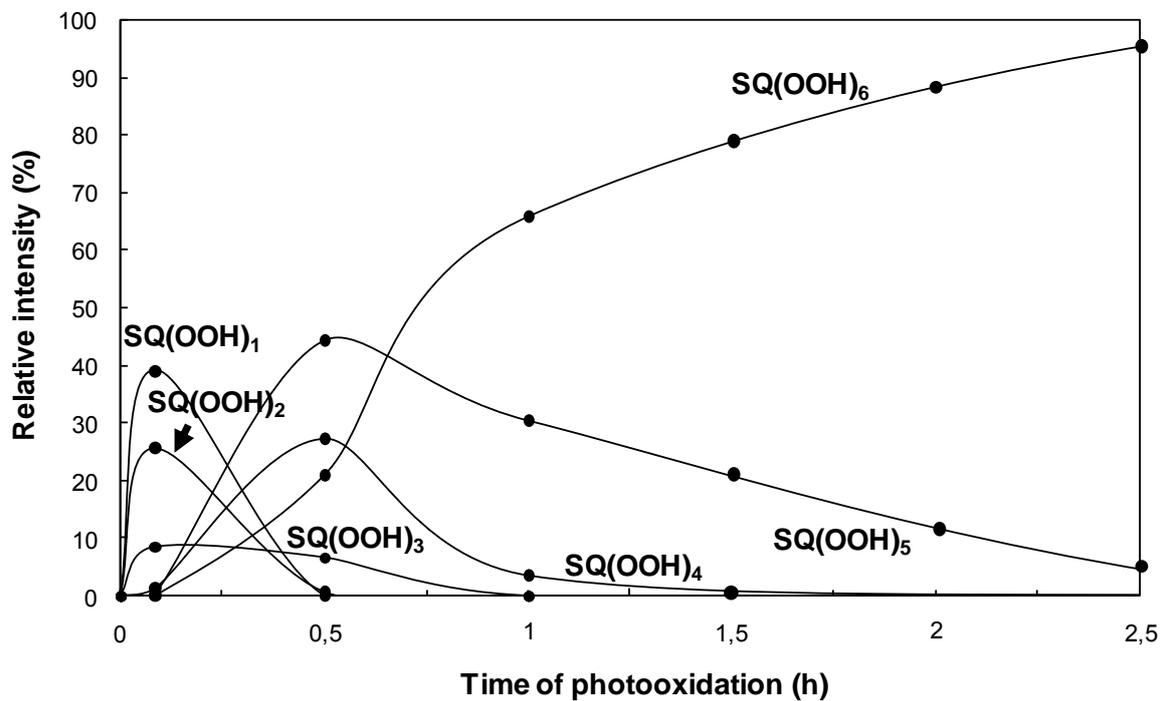


Figure S4. Stepwise polyperoxidation of squalene during its photooxidation in acetone: relative intensities of HPLC peaks of the squalene hydroperoxides $SQ(OOH)_n$ as a function of irradiation time. Conditions: $[SQ] = 3 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, $[RB] = 1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $T = 5^\circ\text{C}$.

S5: Photooxidation of SQ in methanol

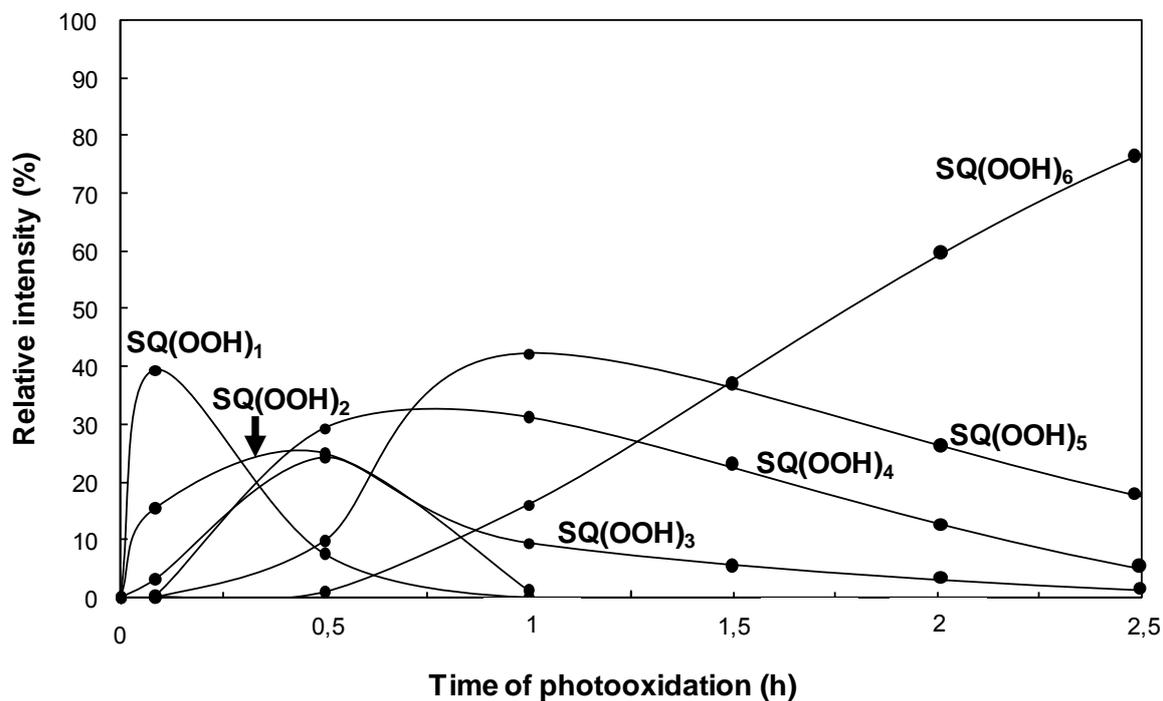


Figure S5. Stepwise polyperoxidation of squalene during its photooxidation in methanol: relative intensities of HPLC peaks of the squalene hydroperoxides SQ(OOH)_n as a function of irradiation time. Conditions: $[\text{SQ}] = 3 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, $[\text{RB}] = 1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $T = 5^\circ\text{C}$.

S6: NanoESI-Qq-TOF MS spectra of squalene hydroperoxides

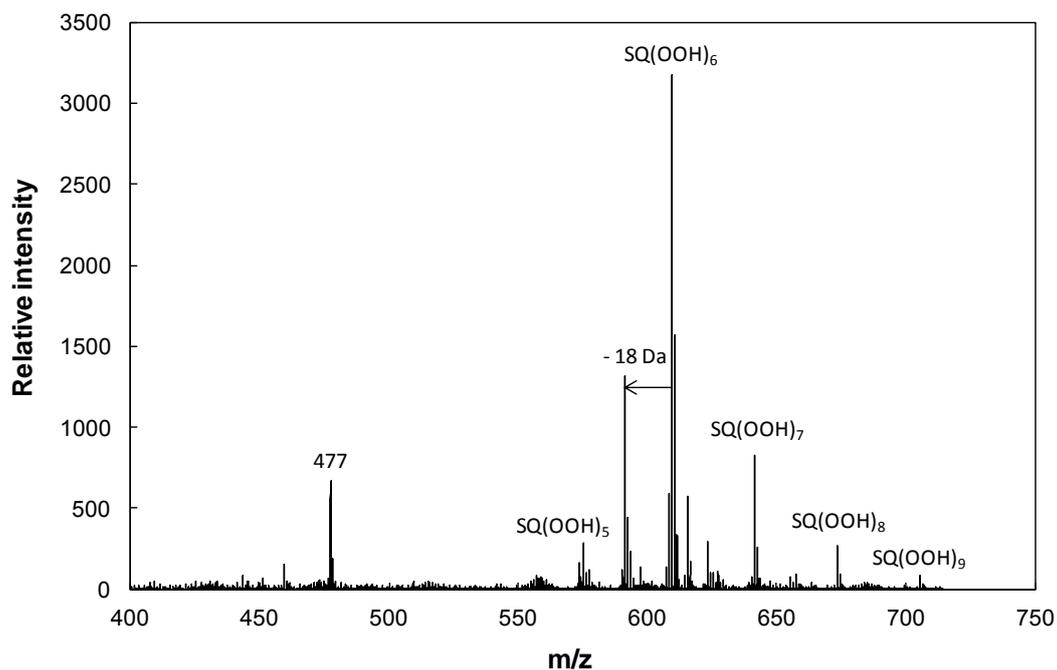


Figure S6.1. NanoESI-Qq-TOF MS spectrum of squalene hydroperoxides formed during the photooxidation of squalene (SQ) in methanol. Conditions: [SQ] = 3×10^{-2} mol L⁻¹, [RB] = 1×10^{-4} mol L⁻¹, T = 5 °C, t = 10h.

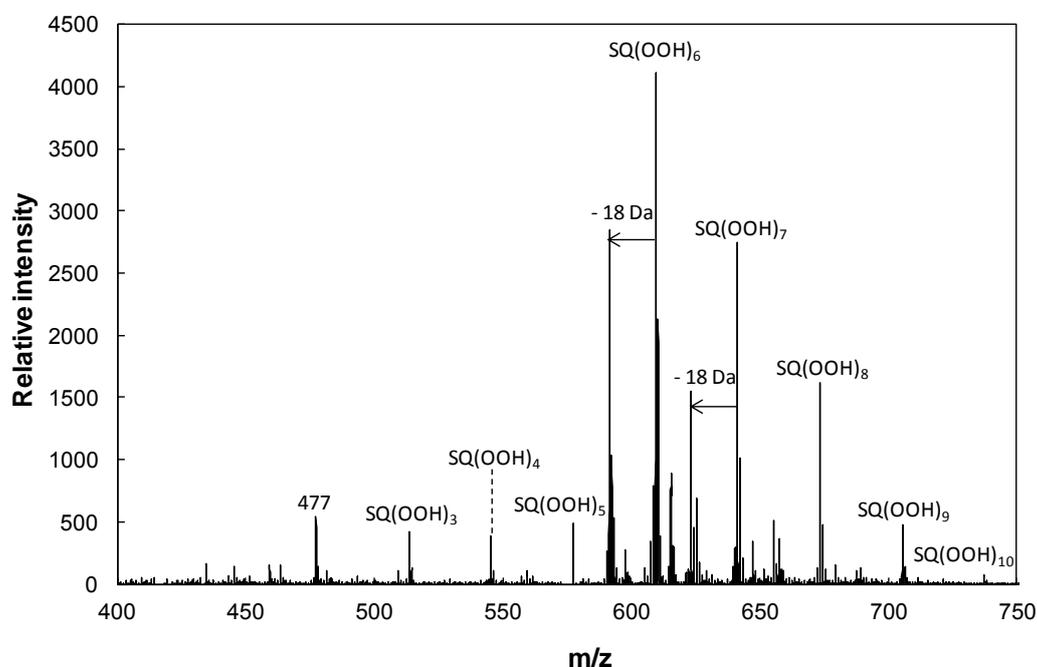


Figure S6.2. Evolution of the nanoESI-Qq-TOF MS spectra of squalene hydroperoxides detected during the photooxidation of squalene (SQ) in methylene chloride. Conditions: [SQ] = 3×10^{-2} mol L⁻¹, [TPP] = 3×10^{-4} mol L⁻¹, T = 5 °C, t = 10h.

Degradative Oxidation of Squalene. Part 2. Formation of Volatiles Released from the Thermal Decomposition of Squalene Hydroperoxides issued from Singlet Oxygenation

Delphine Blonde,^a Stéphanie Delbaere,^b Katherine Thompson,^c Craig Jones,^c Jean-Marie Aubry^a and Véronique Nardello-Rataj^{a*}

^a *Université Lille1, EA 4478 Chimie Moléculaire et Formulation, Equipe Oxydation et Physicochimie de la Formulation, Bât. C6, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. E-mail: veronique.rataj@univ-lille1.fr*

^b *Université Lille Nord de France, CNRS UMR 8516, UDSL, Lille, F-59006 Lille Cedex, France*

^c *Unilever PLC Port Sunlight Laboratory Bebington Wirral, CH63 3JW, United Kingdom*

Keywords: Squalene; Singlet oxygenation; Hydroperoxide; Thermolysis; Degradation; Volatile

Abstract

The oxidative degradation of squalene occurs in two steps. The first one leads to the formation of numerous hydroperoxide isomers as primary oxidation products whereas the second one results in the release of several volatiles of pleasant smell. The thermal degradation of the squalene hydroperoxides SQ(OOH)_n with n = 1 to 6, prepared by photochemical or chemical singlet oxygenation, was investigated by resorting to two complementary techniques. The first one consisted in NMR analyses of solutions in which volatiles were trapped and concentrated. The second one used proton transfer reaction associated with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTICR). These two methods have enabled us to detect more than 20 volatile compounds. Among them, acetone is by far the main product besides methacrolein, acrolein, methylvinylketone, methyl formate, 3-methyl-2-butenal, dimethyl oxirane, acetaldehyde, 4-methylpent-1,3-diene and pent-4-en-2-one, these volatiles contributing to the pleasant smell released from thermal oxidative degradation of squalene. Finally, reaction pathways accounting for their formation have been proposed.

Introduction

Skin is a metabolically active tissue that contains sebaceous glands, which synthesize a broad spectrum of lipids that are excreted to the skin surface and form sebum. Although the function of sebum is still a matter of investigation, it is supposed to play a role in the protection of skin from dehydration, ultraviolet radiation, wrinkling and infection. The sebaceous lipid mixture is highly complex and consists of triacylglycerols, diacylglycerols and free fatty acids, which together account for 50-60% of its composition. Sebum also contains 20-30% wax esters, 10-16% squalene (SQ) and 2-4% cholesterol esters.¹ The carbon-carbon double bonds of the unsaturated lipids in sebum are

oxidized by the air producing hydroperoxides which can decompose into volatile odorous materials including aldehydes, ketones alcohols and hydrocarbons.

Human body odor is generated by waste materials present on the skin surface and secretions from the sweat and sebaceous glands. Metabolism of these compounds by bacterial flora in the skin or by atmospheric oxidation subsequently produces a volatile malodor. Body odor is primarily comprised of low-molecular-weight fatty acids, aldehydes, ketones, nitrogen-containing compounds and sulfur compounds. Changes in body odor due to aging relate to the amount and composition of sweat and sebum secreted, as well as gland activity. 2-Nonenal has an unpleasant, greasy, grassy odor and is mainly detected in people aged over 40 years. Generation of 2-nonenal is related to oxidative degradation of ω 7 unsaturated fatty acids. Such compounds result from the hydroperoxidation of lipids in sebum, the concentration of which increases with aging. Sawano hypothesized that unsaturated fatty acids secreted on the body surface generated the aging odor by being oxidized by the air and metabolized by skin flora bacteria.² Hayakawa *et al.* found that the ratio of peroxide to total lipids gradually increased with age, with the lowest value observed among participants in their 20s.³

Another interesting aspect is that human sebum is also the major source of oily soil on textiles. Auto-oxidation of unsaturated oily soils is associated with 1) undesirable odors on garments, 2) difficulty in removal of oily soils if larger molecules or polymers form in the auto-oxidation reactions, 3) hydroperoxides and some of their breakdown products cause polymerization of protein soils in mixed soil systems leading to colored insoluble complexes, and 4) changes in fabric appearance. However, it has been reported that oxidation of sebum by photo-bleach, which can be present in detergents, appears to reduce the production of a rancid, oily “off” odor.⁴ For example, oleic acid oxidizes in the presence of photo-bleach to produce nonanal (described as fruity), decanal (waxy orange) and decenal (orange peel) and squalene oxidizes to produce sweet smells resembling caramel and honey. In other words, it is possible to consider converting sebum to volatile, pleasant smelling species in the presence of a singlet-oxygen photo-bleach, such as phtalocyanine derivatives, and upon exposure to light.

In this context, it appears thus relevant to understand the release of such volatiles from sebum. Much work has already been devoted to fatty acids⁵ whereas squalene has been much less extensively studied. However, squalene (SQ), with six electron-rich double bonds interrupted by two methylene groups, is prone to oxidative degradation. This process generally involves activated oxygen species such as oxyradicals or singlet molecular oxygen, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) which can be formed as soon as oxygen, dye and light are combined. The photooxidation of SQ yields to the formation of numerous hydroperoxides as primary oxidation products, abbreviated as **SQ(OOH)_n** where n indicates the number of perhydroxyl groups.⁶ Peroxides and hydroperoxides are thermosensitive products and thus, they readily break into various small molecules as reported by numerous papers in the case of unsaturated fatty acids.⁷ Kawano *et al.*⁸ reported six peroxides formed in aerobic oxidation of

squalene, with further decomposition into carboxylic acids, ketones, aldehydes and high molar weight polymerized products. Squalene is believed to undergo the same type of cleavage during oxidative degradation as oleic acid. Yeo and Shibamoto have identified formaldehyde, malonaldehyde acetaldehyde and acetone upon exposure of SQ to ultraviolet (UV) irradiation at 300 nm.⁹ The authors also suggested 6-methyl-5-hepten-2-one as a key intermediate in the degradation pathway. This compound would result from the cleavage between C₆ and C₇ carbon-carbon bond in the 6-hydroperoxide generated from the abstraction of a proton from the C₈ carbon of squalene. The presence of small alkanes and alkenes as minor products has also been suggested during the autoxidation of squalene.¹⁰

Hence, we report herein a detailed mechanistic investigation of the volatile compounds released from the oxidation degradation of squalene. Our approach to a comprehensive determination of the formation of volatiles resulting from the breakdown of hydroperoxides consisted in two steps. First, the squalene hydroperoxides, **SQ(OOH)_n** with n = 1 to 6, were prepared by photooxidation. Thus, several samples of hydroperoxide mixtures with specific degrees of peroxidation could be isolated. Then, their subsequent thermal decomposition at 80 - 100 °C was investigated by resorting to two methods. The first one consisted in NMR analyses of solutions in which the volatiles were trapped and concentrated whereas the second one used proton transfer reaction associated with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (PTR-FTICR). Finally, from the volatile compounds detected and identified by the two techniques, a mechanism for oxidative degradation of squalene has been proposed.

Material and Methods

Chemicals. Squalene (> 98%), rose Bengal sodium salt (> 90%), tetraphenylporphyrin (99%), sodium molybdate (99%) and methylene chloride (> 99.8%) were purchased from Sigma-Aldrich. Hydrogen peroxide (50 wt.%) was from Prolabo. Acetone (99.5 %) was obtained from Verbièse and methanol (> 99.8%) from SDS. Solvents were of HPLC grade. In all experiments, ultra-pure water of Millipore (resistivity 18.2 MΩ.cm) was used.

NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a gradient-field TXI probe (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C).

High-Performance Liquid Chromatography with UV-Detection. HPLC-UV instrument consisted of a Shimadzu LC-20 AT equipped with C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) and a UV detector (UVSPD20A) ordered at 210 and 240 nm. The eluent was a gradient acetonitrile/water mixture from 50:50 to 100:0 v/v at 1 mL.min⁻¹.

Real-time b-trap MS-FTICR (Mass Spectroscopy of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance).¹¹ About 100 mg of squalene hydroperoxides SQ(OOH)_n were deposited in a nacelle. The

sample was heated at 80 °C in an oven. Volatile compounds released were carried by 200 mL.min⁻¹ of nitrogen flow to the mass transfer line at 170 °C. Mass Spectrum was recorded on B-Trap MS-FTICR developed by AlyXan Company (Orsay, France). Organic compounds were ionized by H₃O⁺ so that the peaks of MH⁺ were detected.

Thin-Layer Chromatography (TLC). TLC analysis was carried out on silica gel plates of aluminum (ALUGRAM SIL G/UV 254) with hexane/diethyl ether/acetic acid (85/15/2 and 25/75/2 (v/v)) as mobile phases. They were visualized with aqueous solutions of Cu₂SO₄ and H₂SO₄ (10%) and heating with a heating-gun.

ThermoGravimetric Analysis (TGA). A TA instruments TGA Q5000 was used for the isothermal thermogravimetric analyses. 10 mg of squalene hydroperoxides were introduced into a platinum pan. The measurements were carried out at 80 °C for 1h under nitrogen at rates equal to 10 mL.min⁻¹ in the balance and 25 mL.min⁻¹ in the oven.

Photooxidation of squalene. Photooxidation of squalene (SQ) was carried out in a 1 cm cell irradiated by Philips Master SON-PIA 250 W sodium lamp. The lamp was 5 cm from the glass cell. A solution of SQ was prepared (0.03 M) in methylene chloride containing 10⁻⁴ M tetraphenylporphyrin as a sensitizer. A stream of oxygen was continuously bubbled into the reaction medium. Temperature was stabilized at 5 °C with a thermo-regulated bath. After removing of the solvent, several of squalene hydroperoxides SQ(OOH)_n (n = 1 to 6) could be obtained according to the irradiation time.

Dark singlet oxidation of squalene. Chemical oxidation of squalene (SQ) was performed with the hydrogen peroxide/sodium molybdate system in methanol. A solution containing 3.10⁻² M SQ and 5.10⁻² M sodium molybdate was placed at 20 °C. Hydrogen peroxide (50 %) was added by batch of 60 µL (0.2 M) after each discoloration of the orange-red solution. At the end of the reaction, sodium molybdate precipitated and methanol was removed under reduced pressure. Traces of methanol could be removed from the squalene hydroperoxides by extraction with methylene chloride (10 mL) and collected after solvent evaporation.

NMR analysis of volatiles from thermolysis of squalene hydroperoxide isomers. 100 mg of squalene hydroperoxides SQ(OOH)_n (n = 1 to 6) were deposited into a glass flask which was heated at 80 °C. Volatile compounds formed through hydroperoxide decomposition were carried by an argon flow, collected and concentrated with a needle as gas outlet into a 1.5 mL GC vial filled with 500 µL CDCl₃ and which was cooled at -8 °C. The concentrated solution was analyzed by NMR spectroscopy.

Results and Discussion

1. Preparation of squalene hydroperoxides SQ(OOH)_n with n = 1 to 6 and their thermal stability.

It is well known that hydroperoxides of unsaturated fatty acids in triacylglycerols and lipids present in fats and oils are formed by autoxidation and are very unstable breaking down into a wide variety of

volatile compounds, notably flavors of which the most significant are aldehydes, as well as non volatile products.¹² It is also admitted that hydroperoxide decomposition results from a free radical process involving a homolytic β -scission of the alkoxy radicals coming from allylic hydroperoxides favoring the formation of aldehydes.¹³ The aromas of aldehydes are often responsible for the undesirable flavors in fats and oils. As some examples, hexanal and 2,4-decadienal have been identified as the primary oxidation products of linoleate arisen from 13- and 9-hydroperoxides of linoleate respectively.¹⁴ In a same way, ketones can be formed, e.g. Guth and Grosch have identified 1-octen-3-one from decomposition of 10-hydroperoxide linoleate.¹⁵ Snyder *et al.*¹⁶ have reported a list of volatile compounds generated after the 8 days storage of different vegetable oils at 60 °C.

In order to study the volatiles released from the oxidative degradation of squalene, the hydroperoxides were prepared by photooxidation in methylene chloride. Indeed, this solvent is convenient for production of hydroperoxides on the preparative scale and it is highly unlikely that it belongs to the volatiles released, contrary to acetone and methanol. As previously reported, different samples of SQ hydroperoxides of variable peroxidation degrees can be obtained according to the irradiation time. Table 1 reports the approximate composition of the different samples prepared by photooxidation.

Table 1. Composition of mixtures of squalene hydroperoxide isomers as a function of the time of photooxidation in methylene chloride.

Sample	Time of irradiation (h)	Approximate composition
1	0.1 (5 min)	<p>≈ 85% SQ</p> <p>≈ 10% SQ(OOH)₁</p> <p>≈ 5% SQ(OOH)₂</p>
2	0.5 (30 min)	<p>≈ 65% SQ(OOH)₁</p> <p>≈ 30% SQ(OOH)₂</p> <p>≈ 5% SQ(OOH)₃</p>
3	1	<p>≈ 35% SQ(OOH)₁</p> <p>≈ 40% SQ(OOH)₂</p> <p>≈ 20% SQ(OOH)₃</p> <p>< 5% SQ(OOH)₄</p>
4	3	<p>< 5% SQ(OOH)₅</p> <p>> 95% SQ(OOH)₆</p>
5	6	<p>SQ(OOH)₆</p> <p>+ other (cyclic) peroxides</p>
6	10	<p>SQ(OOH)₆</p> <p>+ other (cyclic) peroxides</p>

Sample 1 still contains a lot of squalene itself as it corresponds to the first minutes of photooxidation. Samples 2 and 3 are rich in mono- and di-hydroperoxide isomers respectively. The

others mainly contain the hexahydroperoxide isomers $\text{SQ}(\text{OOH})_6$, sample 4 being probably the “purest” one. Then, we carried out thermogravimetric analyses of the different samples of hydroperoxides in order to evaluate their stability towards decomposition, in other words the amount of volatiles that can be released. It is noteworthy that after decomposition, a polymeric and sticky residue is obtained as already reported. Figure 1 reports the TGA curves of the different samples.

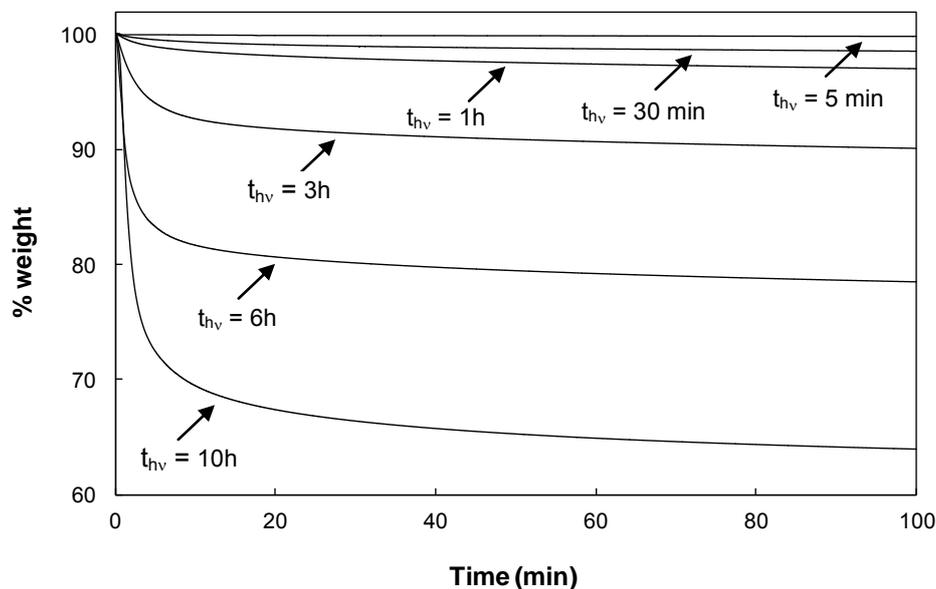
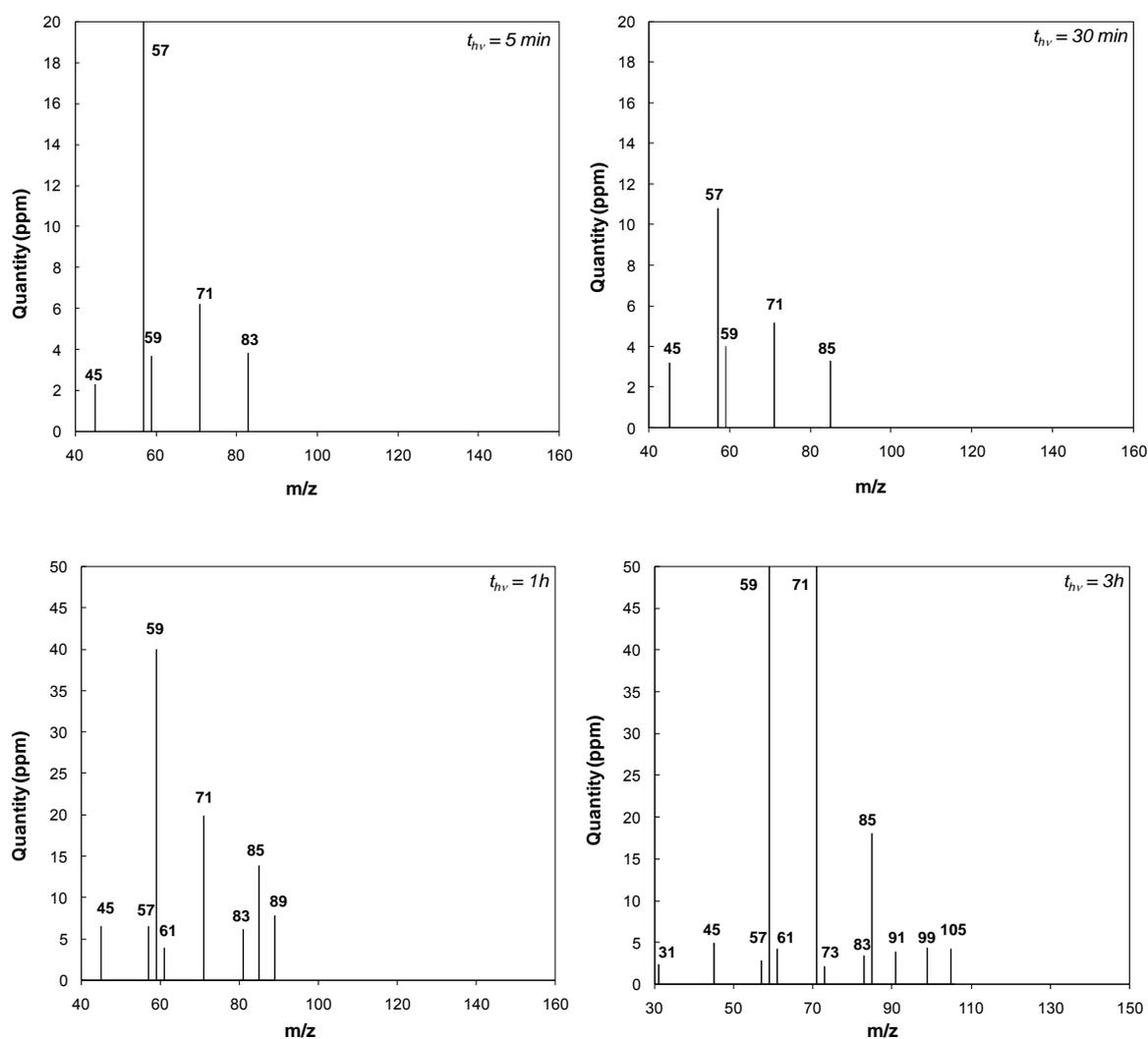


Figure 1. Thermogravimetric analyses at 80 °C of squalene hydroperoxide samples collected during photooxidation in methylene chloride.

TGA curves of squalene hydroperoxide thermolysis show an increase of weight loss with the peroxidation degree. For the 5 minute photooxidation sample, the weight loss is of about 1% after 2 hours at 80 °C because the sample still contains a lot of squalene which is stable at this temperature. For the samples corresponding to $t_{hv} = 30$ min and 1h, the weight losses are about of 2 and 3% respectively in agreement with the low peroxidation degree of the main compounds of these samples namely $\text{SQ}(\text{OOH})_1$ and $\text{SQ}(\text{OOH})_2$. On the other hand, from 3h of photooxidation, in other words for samples rich in $\text{SQ}(\text{OOH})_6$, the weight losses are more significant, respectively ≈ 10 , 22 and 36%. This result indicates that the more squalene is peroxidized, the more it is unstable. The TG profiles at 80 °C show that the major part of hydroperoxides are easily decomposed during the first 20 min whereas the other part of the sample polymerizes as indicated by the sticky solid residue recovered in the cell. However, it is noteworthy that for high peroxidation degrees, the complete removing of the solvent of photooxidation is not straightforward as we have to take care to not degrade the hydroperoxides and thus, the relatively high weight loss can be over-estimated regarding the amount of released volatiles.

2. Real-time MS-FTICR analysis of volatile products.

Volatiles released from the SQ hydroperoxides previously prepared were analyzed by MS-FTICR (Mass Spectroscopy of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance), a technique developed by AlyXan Company (Orsay, France) for real-time monitor of VOC (Volatile Organic Compound) in trace quantity. The method has already been used to follow the volatile product formation during polymer thermo-degradation.¹⁷ Soft chemical ionization is performed by using H_3O^+ (m/z 19.03) as precursor which transfers a proton to the target molecule. This method is valid for almost all the organic molecules apart from the alkanes, and it is inactive to the air compounds like O_2 , N_2 , Ar and CO_2 . The samples containing the sample of $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ were heated at 100 °C. Figure 2 shows the mass spectra obtained as a function of the peroxidation degree of the hydroperoxide mixtures, i.e. irradiation time, at a time equal to 7 min.



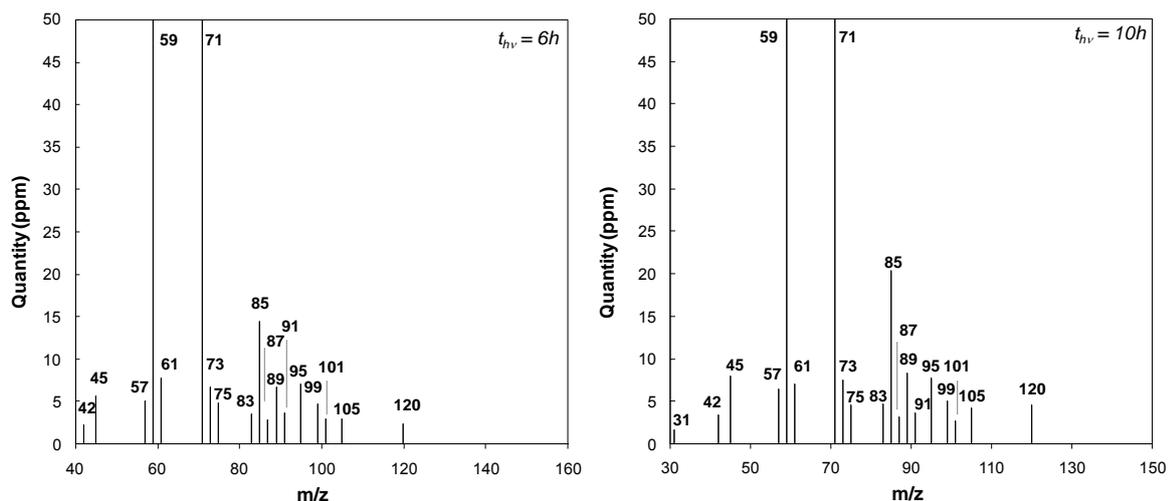


Figure 2. MS-FTICR spectra of the hydroperoxide isomers thermo-decomposed at 100 °C as a function of irradiation time. Time of analysis = 7 min. The hydroperoxide samples were obtained by photooxidation of squalene in methylene chloride.

First, we can comment that the MS-FTICR technique is particularly well suited for the detection of low amounts of volatiles released from the squalene hydroperoxide thermal decomposition. We can then notice that six main peaks at $m/z = 45, 57, 59, 71, 83$ and 85 are present in all mass spectra, whatever the peroxidation degree of the hydroperoxide sample. On the other hand, with the increase of photooxidation time and thus peroxidation degree, the number and the quantity of volatiles released increase as well. Thus, for $t_{hv} = 1, 3, 6$ and $10h$, the number of significant detected volatiles is respectively equal to 8, 12, 18 and 19. While some compounds present lower molecular weight as $m/z = 42$ or $m/z = 31$, the increase of $-OOH$ number leads to the formation of heavier molecules as at $m/z = 105$ or $m/z = 120$. Nevertheless, the majority of supplementary peaks present m/z values between 70 and $100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

The two first mass spectra at $t_{hv} = 5$ and 30 min shows that the quantity of VOCs is lower than 12 ppm except for the volatile at $m/z = 57$ which is major. With the increase of the number of peroxy groups as the photooxidation proceeds, the peaks at $m/z = 59$ and 71 increase progressively until 248 and 55.4 ppm respectively for the most peroxidized samples. For the other products, the quantity cannot be evaluated only from one mass spectrum since it represents a given time and does not correspond to a cumulative amount. However, we have reported in Supporting Information **S1** the profile times of the main volatiles released during the decomposition experiment. These evolutions confirm that the more squalene is peroxidized, the more the quantity of VOCs released is important. It is also important to note that even when the samples contain cyclic peroxides as those probably formed beyond 3h of photooxidation, volatiles are still released. Frankel *et al.*^{5b} have reported that the hydroperoxy cyclic peroxides would contribute with the same type of aldehyde cleavage products as the hydroperoxides without cyclisation, which may justify the continuous increase of the VOC number.

For comparison, a sample of hexahydroperoxide isomers prepared by dark singlet oxygenation, with a total amount of H_2O_2 equal to 2 M, has been analyzed under the same conditions (Figure 3).

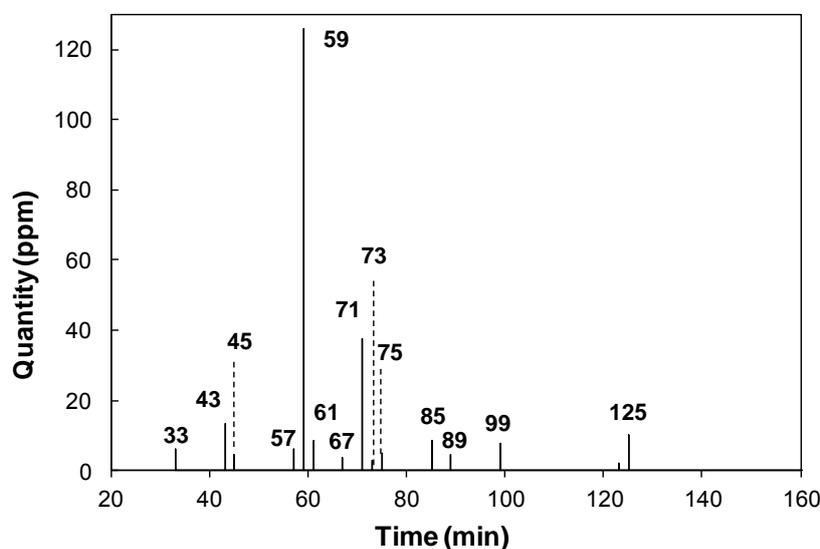
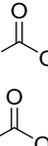
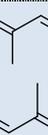


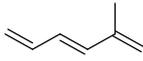
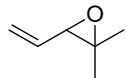
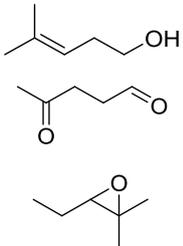
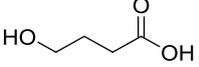
Figure 3. MS-FTICR spectrum of a sample containing mainly the $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ hydroperoxide isomers thermo-decomposed at $100\text{ }^\circ\text{C}$ - $t_{\text{analysis}} = 10\text{ min}$. The hydroperoxides were obtained by chemical oxidation of squalene with $^1\text{O}_2$ chemically generated from the $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$ system ($[\text{H}_2\text{O}_2] = 2\text{ M}$).

The MS-FTICR analysis of volatile compounds released from squalene hydroperoxides prepared by dark singlet oxygenation exhibit roughly the same peaks as those observed previously but some differences can also be pointed out. The mass spectra on Figure 3 corresponds to the thermal degradation of a sample containing mainly $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ and obtained with 2 M of H_2O_2 . Fourteen volatiles were mainly detected including 8 peaks common with those observed on the spectrum corresponding to $t_{\text{hv}} = 3\text{ h}$ which has nearest initial composition. These peaks are at m/z 45, 57, 59, 61, 71, 73, 85 and 99. However, six other peaks at m/z 33, 43, 67, 75, 89 and 125 were not detected with the photochemical samples. It is noteworthy that the peak at $m/z = 33$ is an artifact and corresponds to residual methanol, i.e. the solvent used to carry out the chemical oxidation. Except peaks at m/z 43, 67 and 125 which could not be assigned to defined volatiles, the peak at m/z 75 was plausibly assigned to 3-hydroxypropanal whereas the peak at m/z 89 corresponds to 2-hydroxy-2-methylpropanal and ethyl acetate, which were also confirmed by NMR spectroscopy (see later).

Table 2 summarizes the different peaks detected by the MS-FTICR technique and gives some possible assignments to the different molecular weights.

Table 2. MS-FTICR detection of volatiles released by thermal decomposition of squalene hydroperoxides SQ(OOH)_n. Compounds in bold have also been detected and identified by NMR (see later) whereas in blue, we have indicated the peaks found in all the MS spectra.

MH ⁺ (m/z)	Formula	MW(g.mol ⁻¹)	Assignment	Chemical structure
31	CH ₂ O	30	Formaldehyde	
43	C ₃ H ₆	42	(propene)	
45	C ₂ H ₄ O	44	Acetaldehyde	
57	C ₃ H ₄ O	56	Acrolein	
59	C ₃ H ₆ O	58	Acetone	
61	C ₂ H ₄ O ₂	60	Methyl formate (acetic acid)	
71	C ₄ H ₆ O	70	Butenal Methacrolein Methylvinylketone	
73	C ₄ H ₈ O ₂	72	Dimethyl oxirane	
75	C ₃ H ₆ O ₂ C ₄ H ₁₀ O	74	3-Hydroxypropanal	
83	C ₅ H ₆ O	82	4-Methylpent-1,3-diene	
85	C ₆ H ₁₂ C ₅ H ₈ O	84	Pentenal 3-Methyl-2-butenal Pent-4-en-2-one	
87	C ₄ H ₈ O ₂	86	(Vinyl acetate) 2-Methyl-3-en-ol 4-Hydroxybut-3-en-2-one	
89	C ₄ H ₈ O ₂	88	2-Hydroxy-2-methylpropanal Ethyl acetate	
91	C ₃ H ₆ O ₃	90	(Lactic acid)	

95	C_6H_6O C_7H_{10}	94	2-Methyl-1,3,5-hexatriene	
99	$C_6H_{10}O$ $C_5H_6O_2$	98	Hexenal 2,2-Dimethyl-3-vinyl-oxirane	
101	$C_4H_4O_3$ $C_5H_8O_2$	100	4-Methylpent-3-en-1-ol 4-Oxopentanal 3-Ethyl-2,2-dimethyloxirane	
105	$C_4H_8O_3$	104	(hydroxybutyric acid)	
120	$C_4H_7O_4$ $C_5H_{11}O_3$	119	<i>nd</i>	<i>nd</i>

nd = not determined.

This analytical method is very selective and can detect all compounds with a protonic affinity higher than the one of water ($691 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), used as a precursor. Thus, residual solvent is not a problem because the protonic affinity of dichloromethane ($628 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) is lower than the one of water. Except alkanes, all compounds can be tracked down with this apparatus. In this case, thermolysis has been realized under nitrogen in order to avoid supplementary oxidation. To find the possible formulae corresponding to the molecular weights, only products compound with C, H and O were considered. Moreover, the main compounds performed during squalene hydroperoxide thermolysis are aldehydes, ketones or alcohols in agreement with the literature.¹⁸

The most important product corresponds to acetone (m/z 59.04) and the second important peaks (m/z 71.05) can be assigned to methacrolein or methylvinylketone. Whatever the photooxidation time is, they are detected in all the mass spectra that indicates the predominance of their formation in the degradation mechanism as in the case of 4-methylpent-1,3-diene ($m/z = 83$) or pent-4-en-2-one or 3-methyl-2-butenal or pentenal ($m/z = 85$). In addition to the three products at $m/z = 59$, 71 and 85, except for the first peroxidation degrees, many minor compounds were detected, each of them representing less than 10% of the acetone signal.

Figure 4 represents the evolution of the amounts of the volatiles detected at $m/z = 59$, 71 and 85 in other words to acetone, methacrolein and pent-4-en-2-one, the major ones.

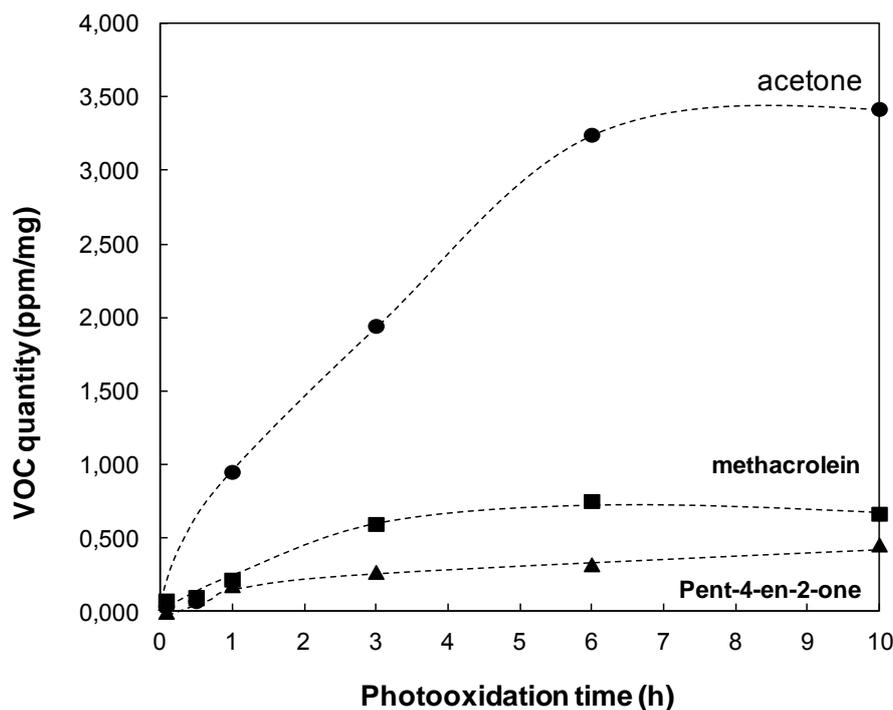


Figure 4: Evolution of the VOC quantity (ppm/mg) according to the photooxidation time of sample (h) for the three major compounds at $m/z = 59, 71$ and 85 released during the B-trap analysis.

B-trap analysis is also a quantitative method thanks to the presence of an internal standard, difluorobenzene. Thus, the evolution of the quantity of the main major compounds released during squalene hydroperoxide thermolysis shows the increase of quantity with the photooxidation time of the degraded sample in agreement with the increase of peroxidation degree of the mixture.

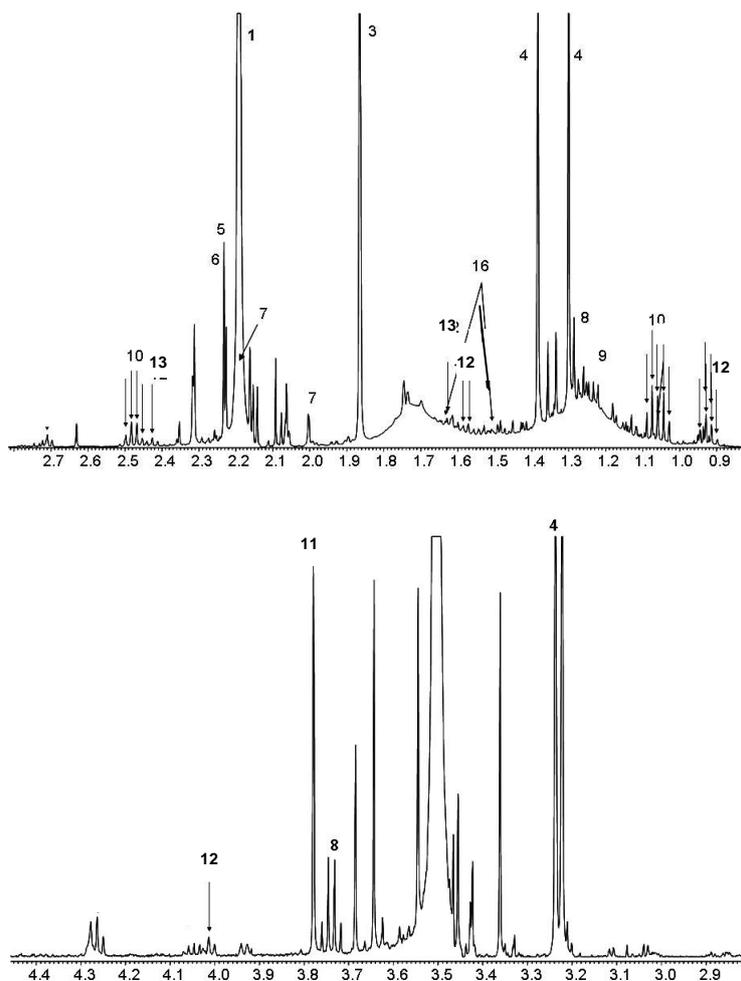
Until 3 hours of photooxidation, the hydroperoxide thermolysis leads to small compounds with molecular weight lower than $100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ what indicates some disparity of the peroxide groups along the squalene chain. Moreover, the mass spectra show the formation of some oxiranes at $m/z = 73, 99, 101$ which confirm the cyclization of alkoxy radicals from the $\text{SQ}(\text{OOH})_4$ isomers.

Mass analyses bring precious information regarding the volatiles released. Nevertheless, the main difficulty for the reading of results is that for one molecular weight, different formulae can correspond.

2. Trapping and NMR identification of volatiles released during thermo-degradation of $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ hydroperoxides.

The MS-FTICR technique combined with a B-trap analyzer is a direct and well suited method for the detection of small amounts of volatiles released by thermal decomposition of a given substrate. However, mass peaks can correspond to several chemical structures and a complementary technique is thus required to identify unambiguously the volatile compounds. The most appropriate technique for chemical structure identification is NMR spectroscopy. Thus, samples of hydroperoxides were

introduced into a glass flask with a gas flow and heated at 80 °C. Volatile compounds released were collected directly into cooled CDCl_3 . After 5h (time necessary to obtain a sufficient concentration of volatile compounds in CDCl_3 to allow for their detection them by NMR), the CDCl_3 solution was analyzed by NMR spectroscopy. The ^1H NMR spectra of the different hydroperoxide samples **1** to **6** are shown in Supporting Information **S2**. Although particularly intricate, they confirm some of the volatiles detected by MS-FTCIR (indicated in bold in Table 2). In Figure 5, we have detailed the ^1H NMR spectra of the volatiles trapped during the decomposition of a “**SQ(OOH)₆**” sample. Table 3 reports the assignment of the identified compounds as well as their relative proportion in the complex mixture. For quantification, naphthalene was added to the sample as an internal calibration reference. The concentration of an unknown compound was calculated by comparing its proton integration to the known naphthalene peak. COSY experiments had been performed to help the understanding and the identification of trapped VOCs by the association of peaks. To avoid the multiplication of the spectrum number, we have choosen here to show final results only on ^1H spectra.



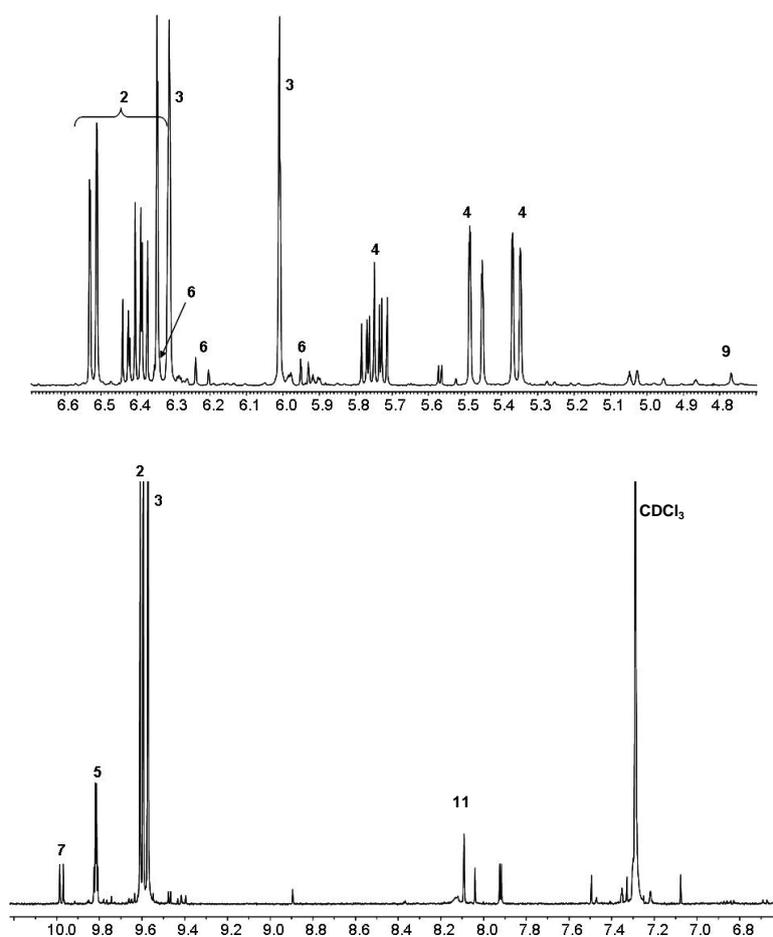


Figure 5. ^1H NMR spectra of volatiles released from the thermo-degradation at $80\text{ }^\circ\text{C}$ during 2 h of a sample of $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ isomers and trapped in cooled CDCl_3 .

Interestingly, two parallel experiments under air flow and under argon gave exactly the same spectrum. Thus, fully oxidized squalene does not require oxygen in its degradation step. This finding indicates that, in the cleavage mechanism, addition of oxygen to an alkyl radical intermediate does not have necessarily to be considered as the main degradation pathway.

Table 3. Volatile compounds formed by thermal degradation at $80\text{ }^\circ\text{C}$ of a sample containing mainly the $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ isomers and identified by NMR.

Entry	Identified structure	Name	conc ($\mu\text{mol/g}$)
Highly probable volatiles			
1		acetone	47.7
2		acrolein	10.6
3		methacrolein	9.9

4		2,2-dimethyl-3-vinyl-oxirane	7.9
5		acetaldehyde	1.1
6		methylvinylketone	0.6
7		3-methyl-2-butenal	0.2
8		ethanol	< 0.2
9		2-methylbut-3-en-2-ol	< 0.2
10		pentan-3-one	< 0.2
11		methylformate	< 0.2
12		ethyl acetate	< 0.2
Uncertain volatiles			
13		heptan-3-one	<i>nd</i>
14		ether derivative	<i>nd</i>
15		oxirane derivative	<i>nd</i>

nd = quantification not determined.

Acetone **1** is by far the main product released from the hydroperoxide decomposition. Surprisingly, a vinyl epoxy product **4** is formed in relatively high concentration, which is rarely reported in the literature. Acetaldehyde **5**, methylvinylketone **6** and 3-methyl-2-butenal **7** have also been found in lower quantities. Traces of ethanol **8** and isopropanol **9** were detected as well. It is worth noting that formaldehyde, which is often mentioned in the literature⁹ was difficult to identify unambiguously with the NMR experiments. We did observe a small proton peak near 9.6 ppm corresponding to that of formaldehyde but this peak overlaps with other compounds. Hence, the presence of formaldehyde must not be excluded as its detection by NMR in the mixture is not straightforward.

3. Mechanism of thermo-decomposition of squalene hydroperoxides

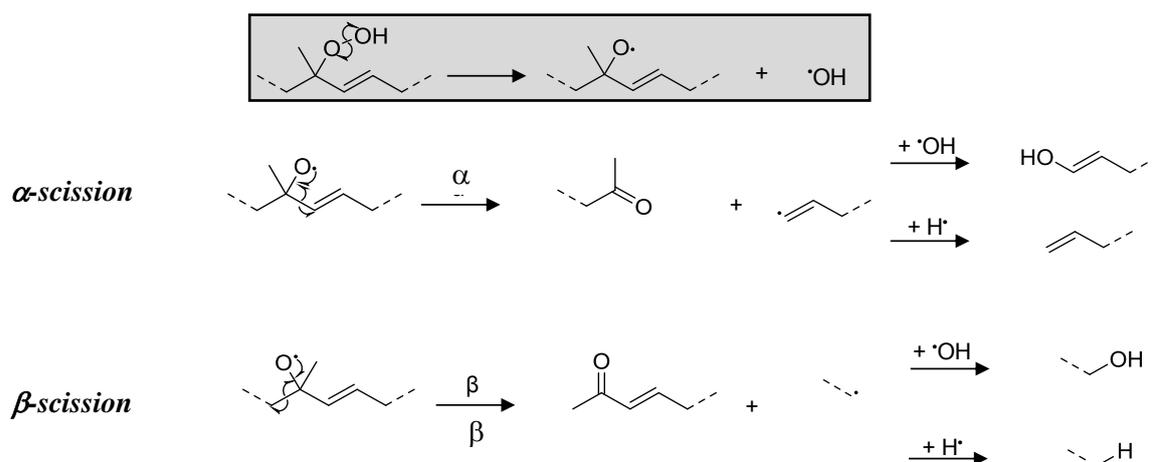
Detailed degradation mechanism of oxidized squalene has been rarely reported in the literature. Volatile degradation products of squalene can be compared to those released by natural rubbers, i.e. *cis*-polyisoprene, which has similar repeating unities as squalene. The most cited products are generally short-chain aldehydes and acids. Particularly, Stein *et al.* have reported the formation of

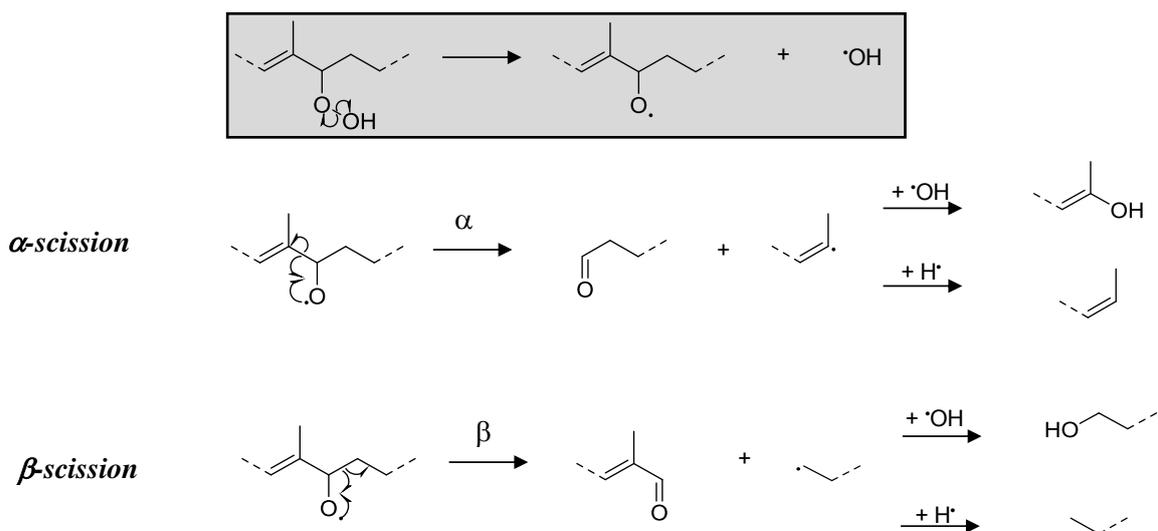
small alkanes and alkenes as products.¹⁰ Bevilacqua et al.¹⁹ have proposed levulinic aldehyde ($C_5H_8O_2$) as a key intermediate, leading to formic acid, acetic acid and CO_2 in the degradation of natural rubber, a *cis*-polyisoprene which has similar repeating units as squalene. Yeo et al.⁹ have reported that 6-methyl-5-hepten-2-one is a key intermediate in the photosensitized degradation of squalene. However, none of these two intermediates has been detected either by NMR or by MS-FTICR in our experiments.

The difficulty in proposing a detailed mechanism for the oxidative degradation of squalene into volatiles essentially lies in the huge number of possible isomers of squalene hydroperoxides, the primary oxidation products. SQ reacts with 1O_2 providing three possible hydroperoxide fragments. Another oxidation mechanism resulting from the autoxidation of SQ has also been proposed in the literature. In both cases, primary oxidation products are hydroperoxides but in the case of autoxidation, the first step is the abstraction of the allylic hydrogen leading to hydroperoxide in positions 4, 8 and 12 without any shift of the double bond. However, this reaction is relatively slow compared to the 1O_2 addition mechanism.

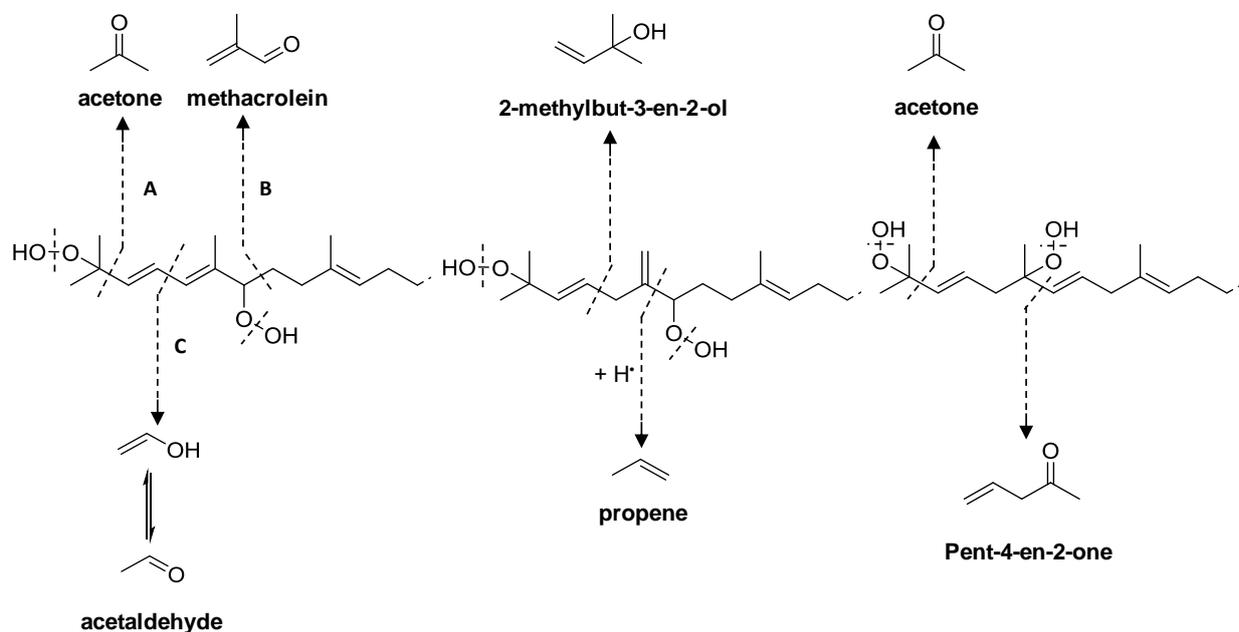
In the following part, the degradation mechanism is discussed on the basis of the first three terpene units. In the case of unsaturated acids, it is well known that hydroperoxydes decompose according to a radical mechanism from α and β -scissions.^{23,27} This main mechanism of hydroperoxide degradation occurs in two steps: 1) alkoxyl radical formation from hydroperoxide group and 2) chain cleavage and volatile compounds formation. Indeed the activation energy to cleave the oxygen-oxygen bond is 46 $kcal.mol^{-1}$ lower than that to cleave the oxygen-hydrogen bond.²⁰ The following scheme transpose this mechanism in the case of terpene hydroperoxydes as $SQ(OOH)_n$.

Decomposition of tertiary hydroperoxides:



Decomposition of secondary hydroperoxides:


The combination of numerous isomers and possible cleavage sites in the squalene hydroperoxides, even in the simplest cases, leads to so many degradation pathways that only prevalent ones accounting for the formation of the detected and identified volatile molecules are discussed. Due to the high number of possible isomers, the initial structure is not well defined. Nevertheless, from the identified VOC structure, we proposed some routes to account for the formation of the different volatiles resulting from α and β scissions of some SQ hydroperoxide patterns.

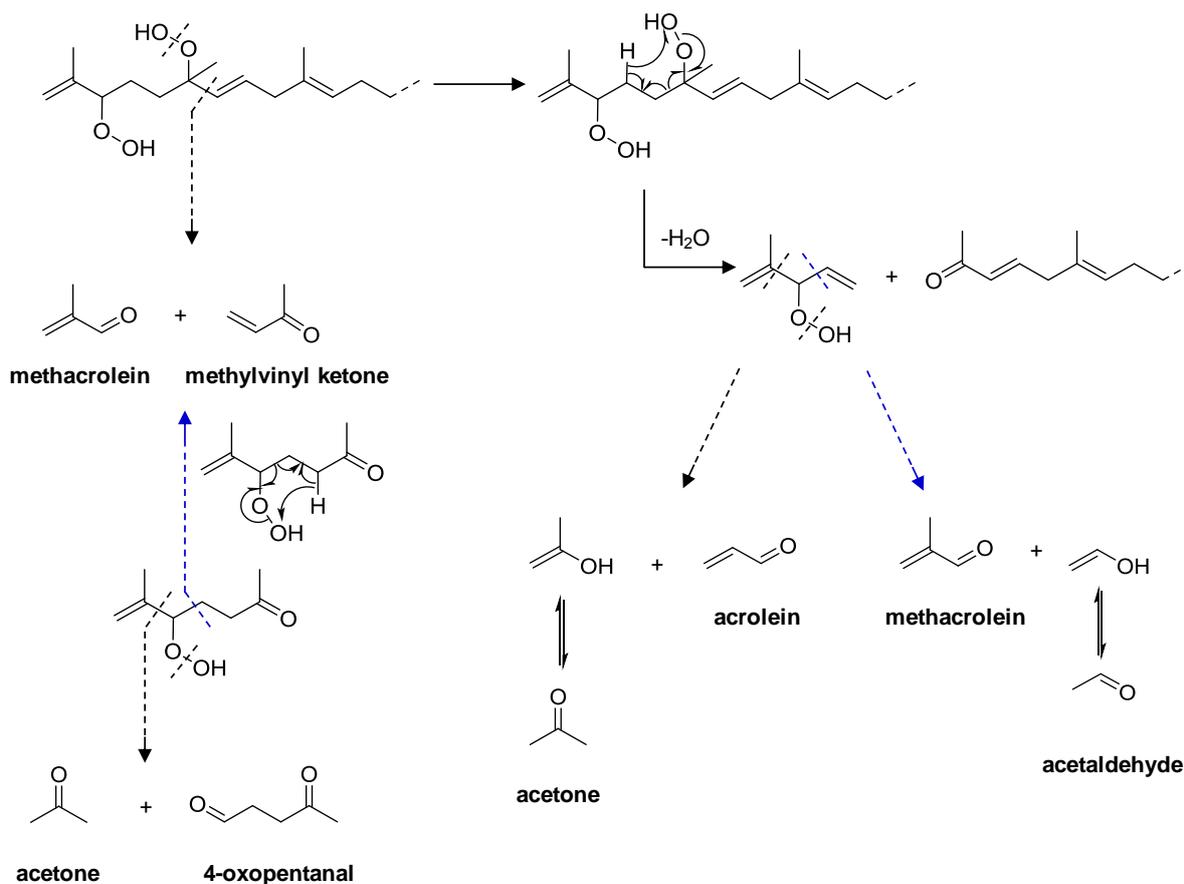


Scheme 1: Possible α and β scissions which can occur in the squalene hydroperoxide and which accounts for the formation of the major detected volatiles.

Scheme 1 explains the formation of the main volatiles resulting from the homolytic scission of alkoxy radical. The high quantification of **acetone**, **methacrolein**, and **pent-4-en-2-one** is confirmed by

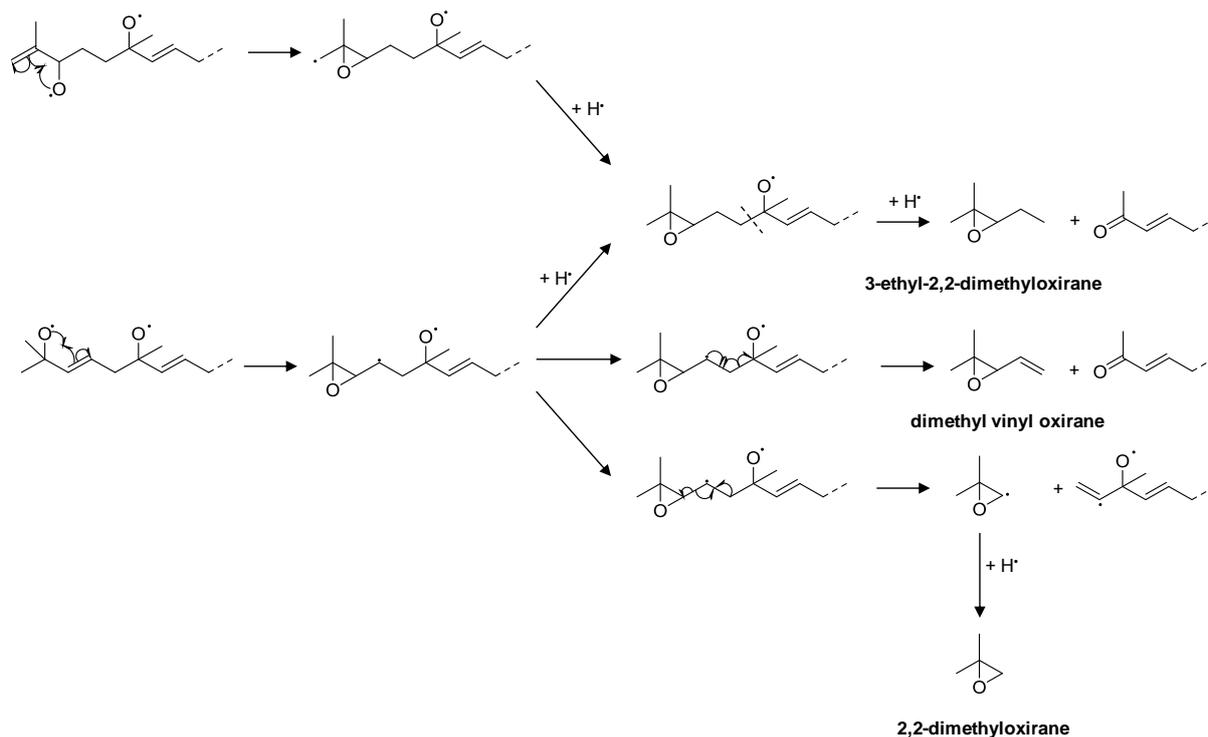
assuming this mechanism. Moreover, the formation of **acetaldehyde**, **2-methylbut-3-en-2-one** and **propene** is also validated.

Even if the α and β scissions can explain the majority of the volatile released, it is not the only one. The thermal interconversion of different isomere hydroperoxydes and the formation of secondary products that may also produce volatiles increase the difficulties. The decomposition at 80 °C leads to relatively slow cleavage so that intra-molecular rearrangements can also be envisaged, leading to the formation of several aldehydes and ketones as detected by NMR and confirmed by mass spectrometry. The following Scheme proposes other routes to explain the formation of some major volatiles.



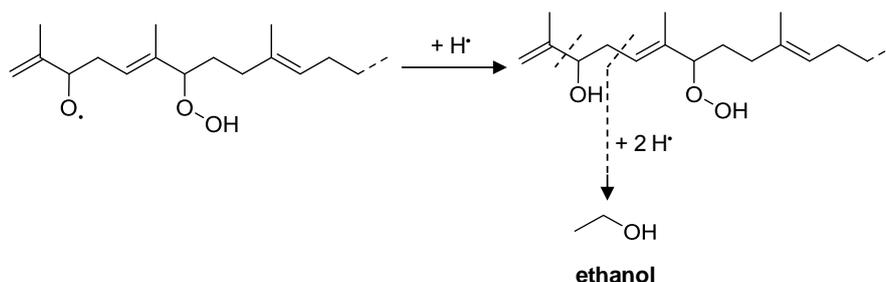
Scheme 2. Suggested mechanism for the generation of small molecules by thermo-degradation of $SQ(OOH)_n$ moiety by an interconversion of peroxide.

Schaich²³ reported a possible cyclization of radical alkoxy into epoxide during radical reaction propagation. This information has been confirmed in our study by the detection by NMR and by mass spectrometry of three different oxiranes. Scheme 3 explains the possible mechanism leading to the release of **2,2-dimethyloxirane**, **dimethyl vinyl oxirane** and **3-ethyl-2,2-dimethyloxirane**.

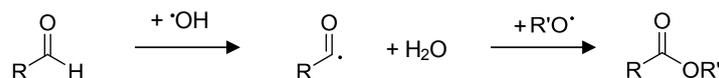


Scheme 3. Proposed mechanism for the generation of 3-ethyl-2,2-dimethyloxirane, dimethylvinyl oxirane and 2,2-dimethyloxirane by the thermodegradation of squalene hydroperoxide at 80°C.

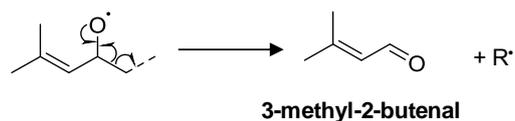
Hydroxyl radicals and hydrogen radical present in the medium can react with other radical compounds. Thus, two close breakings can account for the formation of **ethanol** which has been clearly detected with NMR experiments but not confirmed by mass spectrometry.



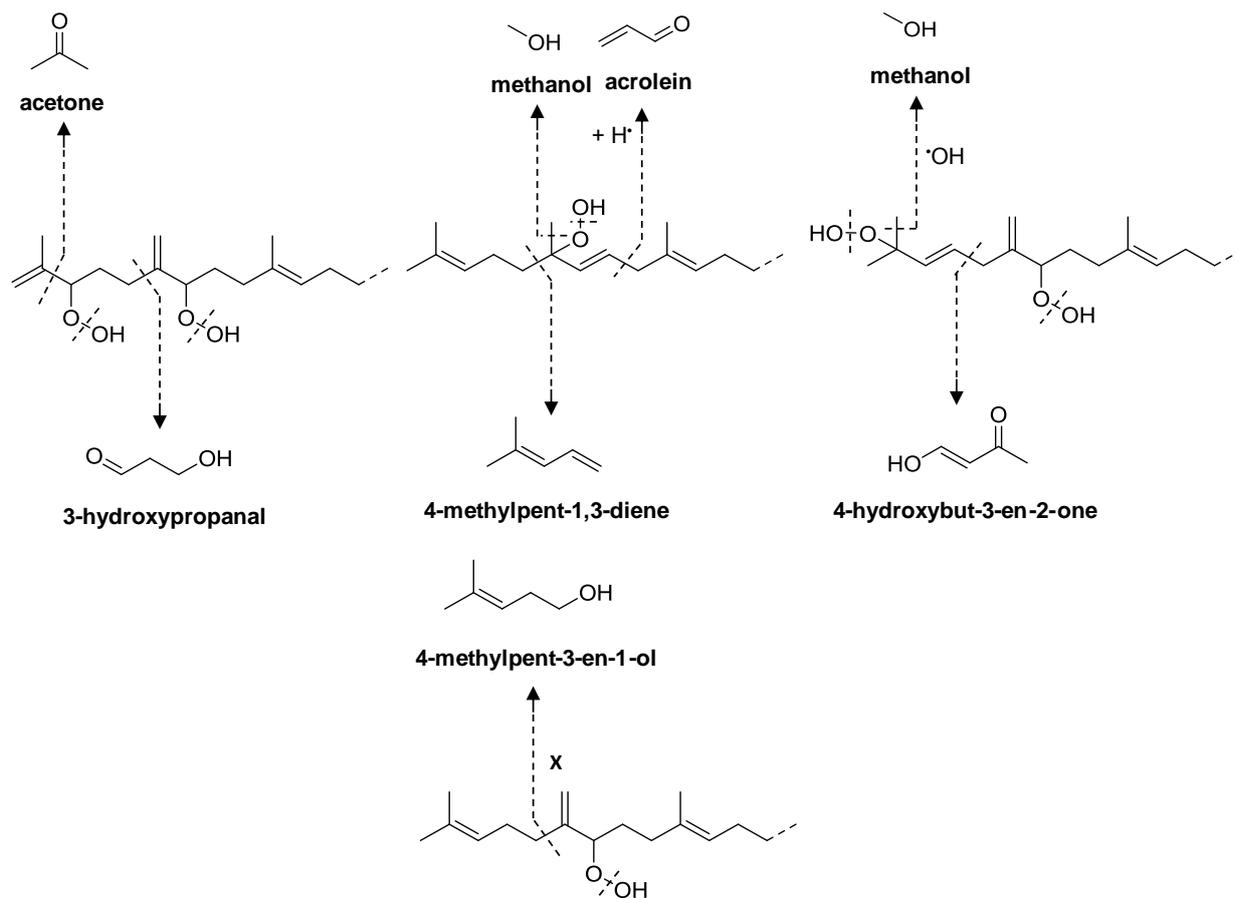
In addition, the formation of ester such as **ethyl acetate** can be justified by a recombination between two radicals as follows:



The formation of **3-methyl-2-butenal**, a minor product that has been detected both by NMR and MS techniques, can be explained by the formation of the 4-OOH hydroperoxide, resulting from the auto-oxidation of squalene, which would undergo a β -scission:



Finally, the formation of 3-hydroxypropanal, 4-methyl-1,3-diene, 4-hydroxybut-3-en-2-one and 4-methylpent-3-en-1-ol can be explained according to the same chain breaking on other hydroperoxide moieties. It is noteworthy that one route releases some methanol which was detected by MS on the chemical hydroperoxide sample but we have supposed that it was some residual solvent.



Conclusion

This work is an in-depth investigation of the oxidative degradation of squalene. The process takes place in two steps: 1) polyperoxidation of squalene giving rise to hydroperoxide isomer intermediates as primary oxidation products and 2) thermo-degradation of the hydroperoxides into secondary volatile compounds which display a pleasant odor unlike the smell of rancidity that may be encountered during the autoxidation of unsaturated fatty acids. The first step, which was investigated previously, provides various hydroperoxide isomers, $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ with $n = 1$ to 6. By resorting to two adapted methods, i.e. NMR analysis of trapped volatiles and real-time MS-FTICR spectrometry, the volatile molecules released from the thermolysis of a sample containing mainly the $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ isomers could be detected and identified. Acetone was found to be the most important product,

followed by methacrolein, acrolein and other carbonyls and alcohols. Cleavage pathways accounting for the formation of the volatiles are similar to those reported for hydroperoxides of unsaturated fatty acids, i.e. resulting mainly in α and β scissions. In addition to scission, the hydrogen transfert or extraction leads to terpenes formation as propene, the cyclization in epoxide explains the detection of oxirane compounds. Moreover, in the same time a polimerization of hydroperoxide has been observed under heat. The real time monitoring of VOC emissions from material degradation confirm that acetone and methacrolein are generally the first VOCs released, validating their formation from the end chain scission. This study is based on detecting traces from a complex system. The coupling of two different but complementary analytical methods has attested to the majority of VOC but has highlighted some incoherence that are difficult to explain due to the number of possible hydroperoxide patterns and ways of radical reaction propagation. The hydroperoxides are known for their allergen properties. This study show that despite the emission of volatile odorants, their decomposition results also in the emission of VOCs known for their toxicity such as acetaldehyde, formaldehyde, methacrolein, acrolein or oxiranes.

References

- 1) S. Yamazaki, K. Hoshino, M. Kusuhara, Odor associated with aging, **2010**, *Anti-aging Medicine* 7(6), 60-65.
- 2) K. Sawano, Body odor, *Jap. J. Taste Smell Res.* **2000**, 7, 3-10.
- 3) R. Hayakawa, H. Ueda, Y. Izawa, Peroxides in sebum, *J. Jap. Cosmet. Sci. Soc.* **1978**, 2, 6-12.
- 4) J.M.R. Aubry, D.Blonde, C.W. Jones, M.S. Mohammadi, K.M. Thompson, D.W. Thornthwaite, Y. Zhu, *Improvements relating to fabric freshness*, EP12305468, **2012**.
- 5) a) K. M. Shaich, Lipid oxidation: theoretical aspect, Bailey's industrial oil and Fat products, 2005.
b) E. N. Frankel, W. E. Neff, E. Selk, Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: VII. Volatile thermal decomposition products of pure hydroperoxides from autoxidized and photosensitized oxidized methyl oleate, linoleate and linolenate, *Lipids*, 16(5), **1981**, 279-285. c) G. Procida, A. C. D. Compagnone, R. M. Maggio, L. Cerretani, M. D. Carlo, Influence of chemical composition of olive oil on the development of volatile compounds during frying. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, 230, 217-229.

-
- 6) a) E. H. Farmer, D. A. Sutton., The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Part II. Hydroperoxidic structure and chain scission in low molecular polyisoprenes. *J. Chem. Soc.* **1942**, 139-148. b) G. Scott, Peroxides. In *Atmospheric oxidation and antioxidants*; G. Scott, Ed.; Elsevier Publishing Co.: Amsterdam, 1965; Chapter 2, p16. c) S Ekanayake Mudiyansele, M Hamburger, P. Elsner, J J. Thiele, *J. Investigative Dermatology*, **2003**, *120*(6), 915-922.
- 7) a) T. O. de Silva, P. A. Pereira. Influence of time, surface-to-volume ratio, and heating process (continuous or intermittent) on the emission rates of selected carbonyl compounds during thermal oxidation of palm and soybean oils *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3129-3135. b) M. C. Garcia-Martinez, G. Márquez-Ruiz, J. Fontecha, M. H. Gordon, Volatile oxidation compounds in a conjugated linoleic acid-rich oil. *Food Chem.* **2009**, *113*, 926-937.
- 8) Y. Kawano, K. Shiomori, A. Shibahara, W. Son, Y. Baba, H. Mitani, Y. Hatate, Degradation by Oxidation of Squalene. *Nihon Yukagakkaiishi* **1997**, *46*, 1361-1367
- 9) H. C. H. Yeo, T. Shibamoto, Formation of formaldehyde and malonaldehyde by photooxidation of squalene. *Lipids* **1992**, *27*, 50-53.
- 10) R. A. Stein, J. F. Mead, Small hydrocarbons formed by the peroxidation of squalene. *Chem. Phys. Lipids*, **1988**. *49*, 117-120.
- 11) S. Sarrabi, X. Colin, A. Tcharkhtchi, M. Heninger, J. Leprovost, H. Mestdagh, Real time analysis of volatile organic compounds from polypropylene thermal oxidation using chemical ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6013-6020.
- 12) C. T. Ho, F. Shahidi, Flavor Components of Fats and Oils, in Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set. Ed. by Fereidoon Shahidi. 2005 John Wiley & Sons, Inc..
- 13) H. W. S. Chan, in H. W. S. Chan, ed., Autoxidation of unsaturated lipids, Academic Press, London, **1987**, pp 17-50.
- 14) C. T. Ho, Y. Zhang, H. Shi, Huang, J. Tang, Flavor chemistry of Chinese foods. *Food Rev. Internat.* **1989**, *5*, 253-287.
- 15) H. Guth, W. Grosch, Deterioration of soybean oil: quantification of primary flavor compounds using a stable isotope dilution assay. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.* **1990**, *23*, 59.
-

- 16) J. M. Snyder, E. N. Frankel, E. Selke, Capillary gas chromatographic analyses of headspace volatiles from vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1985**, *62*, 1675-1679.
- 17) S. Sarrabi, X. Collin, A. Tcharkhtchi, M. Heninger, J. Leprovost, H. Mestdagh, Real Time Analysis of Volatile Organic Compounds from Polypropylene Thermal Oxidation Using Chemical Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6013-6020.
- 18) B. Z. Juita, E. M. Dugogorski, E.M. Kennedy, J.C. Mackie, Mechanism of formation of volatile organic compounds from oxidation of linseed oil, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, *51*, 5653-5661.
- 19) a) E. M. Bevilacqua, Chain Scission in the oxidation of Hevea. IV. Low-molecular-weight products from dry rubber. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2915-2918. b) E. M. Bevilacqua, Products of oxidation of rubber. I. Compounds boiling below water. *J. App. Polymer Sci.* **1964**, *8*, 1029-1038. c) E. M. Bevilacqua, The scission step in hevea oxidation. *J. Polymer Sci.* **1961**, *49*, 495-505.
- 20) R. Hiatt, T. Mill, K. C. Irwin, T. R. Mayo, C. W. Gould, J. K. Castleman, Homolytic decomposition of hydroperoxydes, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 1416-41.

Supporting Information

Degradative Oxidation of Squalene. Part 2. Mechanistic Investigation of the Thermal Decomposition of Squalene Hydroperoxides issued from Photochemical and Chemical Singlet Oxygenation

Delphine Blonde,^a Stéphanie Delbaere,^b Katherine Thompson,^c Craig Jones,^c Jean-Marie Aubry^a and Véronique Nardello-Rataj^{a*}

^a *Université Lille Nord de France, Université Lille 1 and ENSCL, EA 4478 Chimie Moléculaire et Formulation, Equipe Oxydation et Physicochimie de la Formulation, Bât. C6, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. E-mail: veronique.rataj@univ-lille1.fr*

^b *Université Lille Nord de France, CNRS UMR 8516, UDSL, Lille, F-59006 Lille Cedex, France*

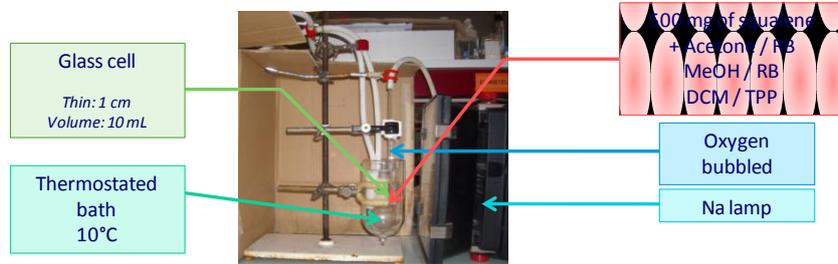
^c *Unilever PLC Port Sunlight Laboratory Bebington Wirral, CH63 3JW, United Kingdom*

Pictures and schemes of squalene oxidation and hydroperoxide degradation	S1
Time profiles of the volatiles released from the SQ hydroperoxides	S2
¹H NMR spectra of volatiles released from the thermal decomposition of squalene hydroperoxide isomers	S3

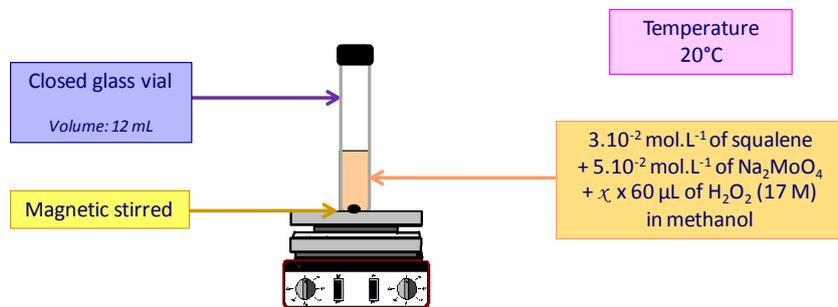
S1: Pictures and schemes of squalene oxidation and hydroperoxide degradation

Squalene oxidation

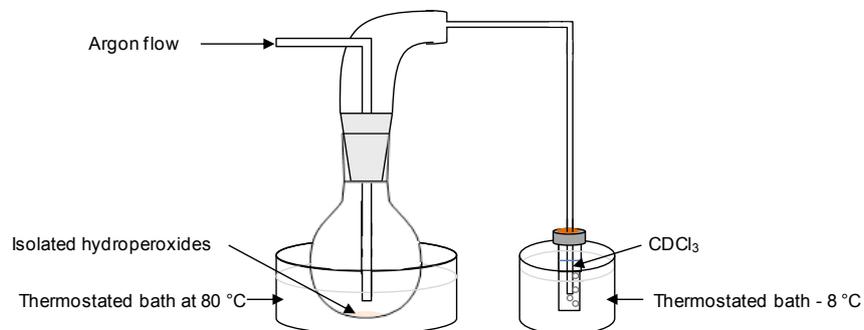
Photooxidation



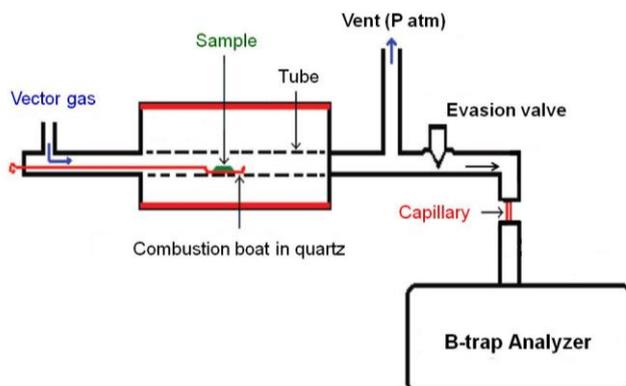
Chemical oxidation



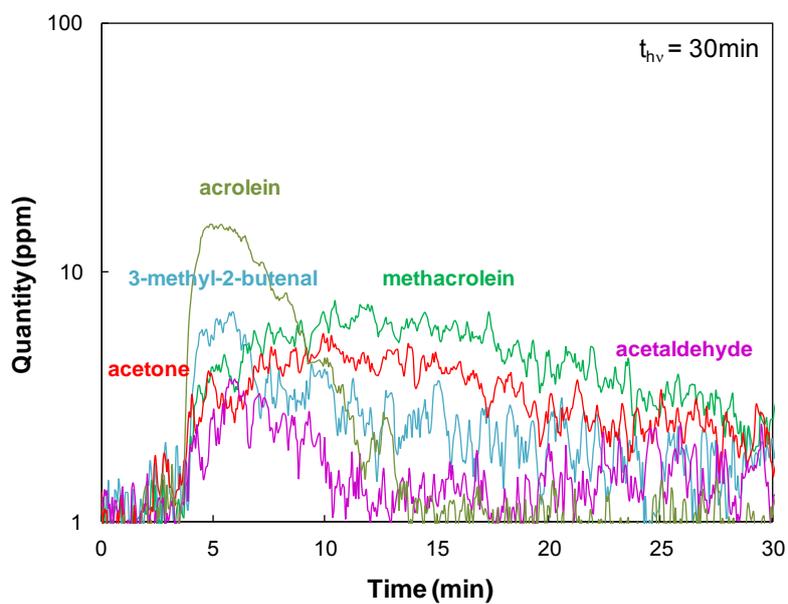
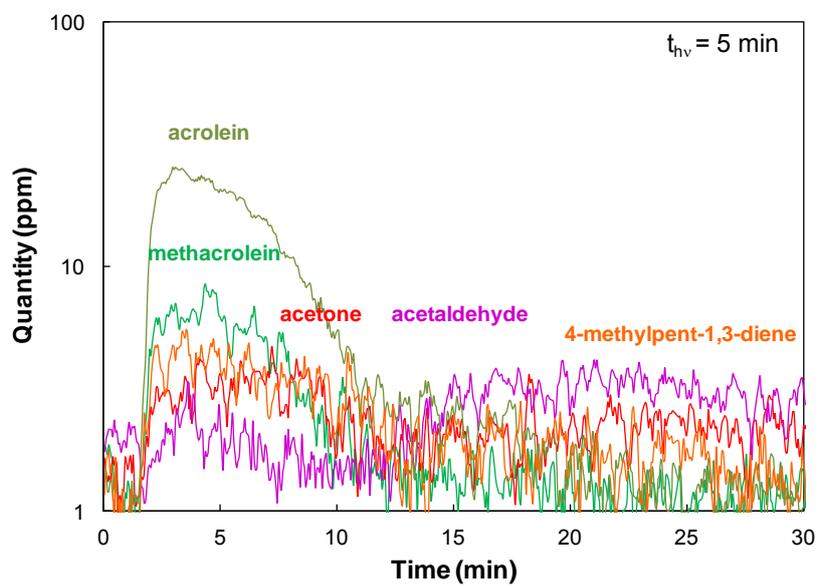
NMR analysis of VOC from squalene hydroperoxide thermolysis

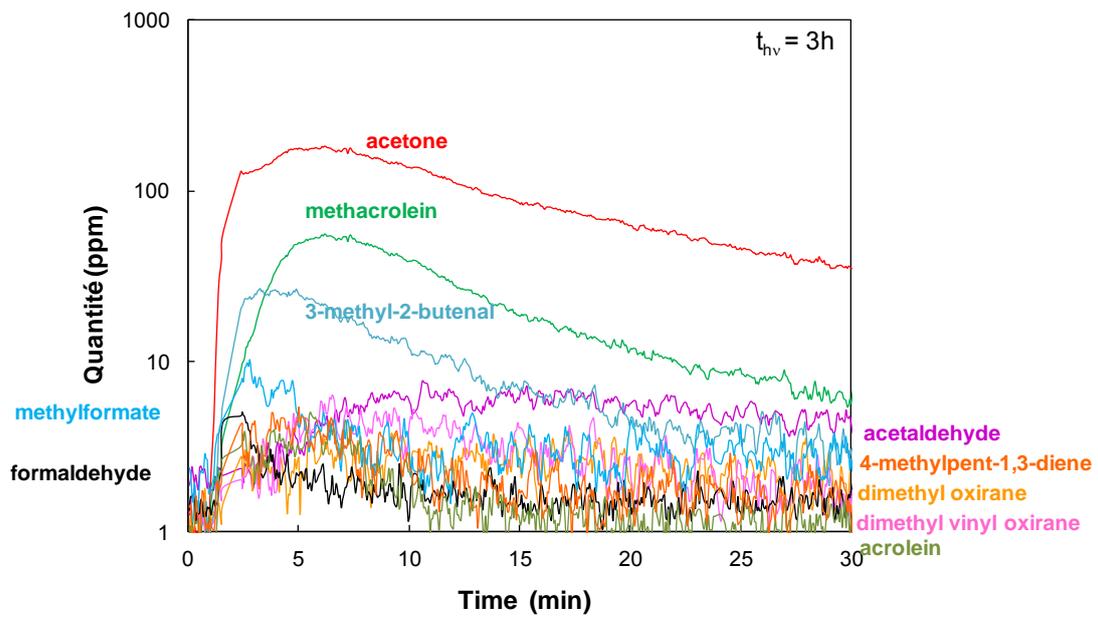
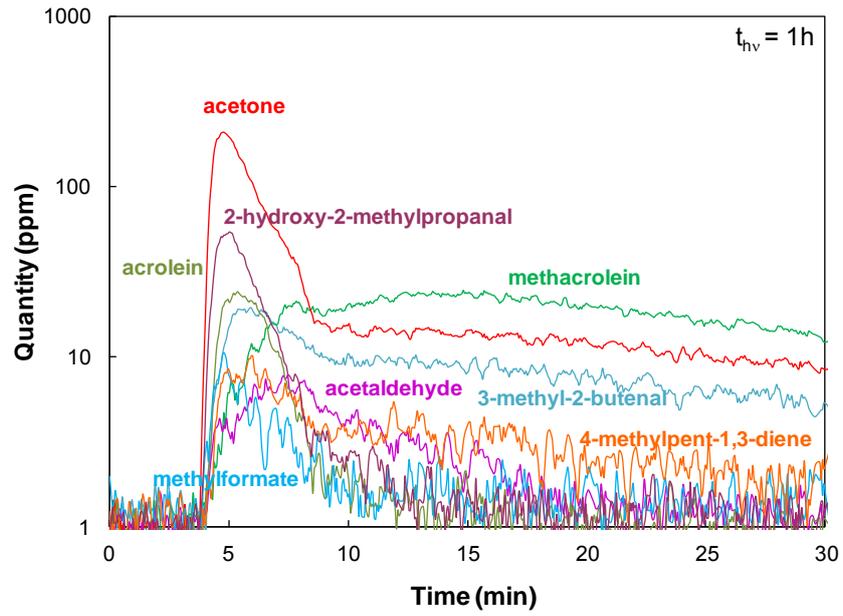


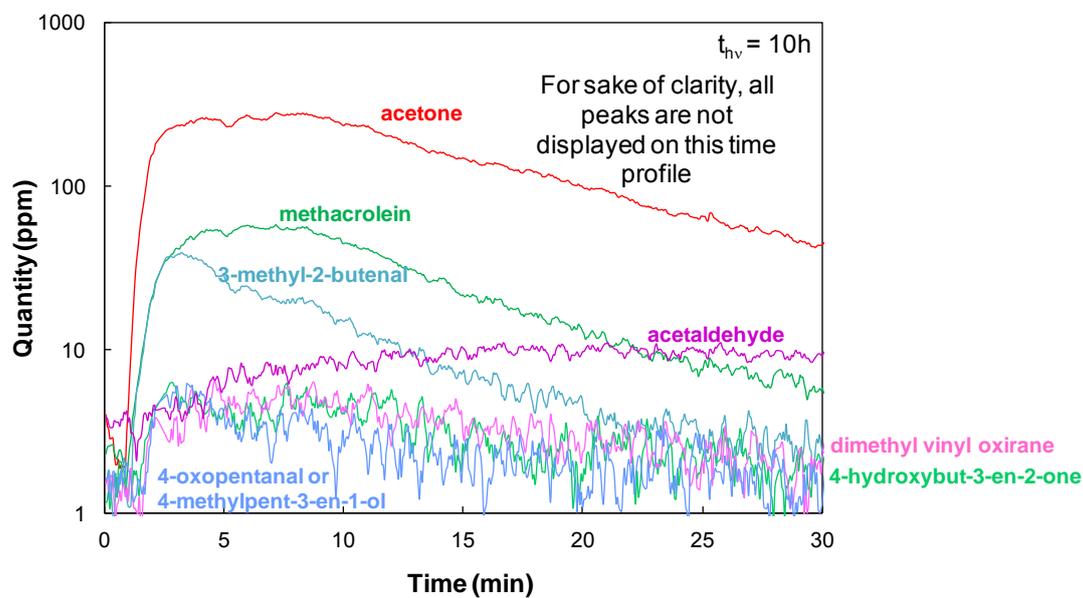
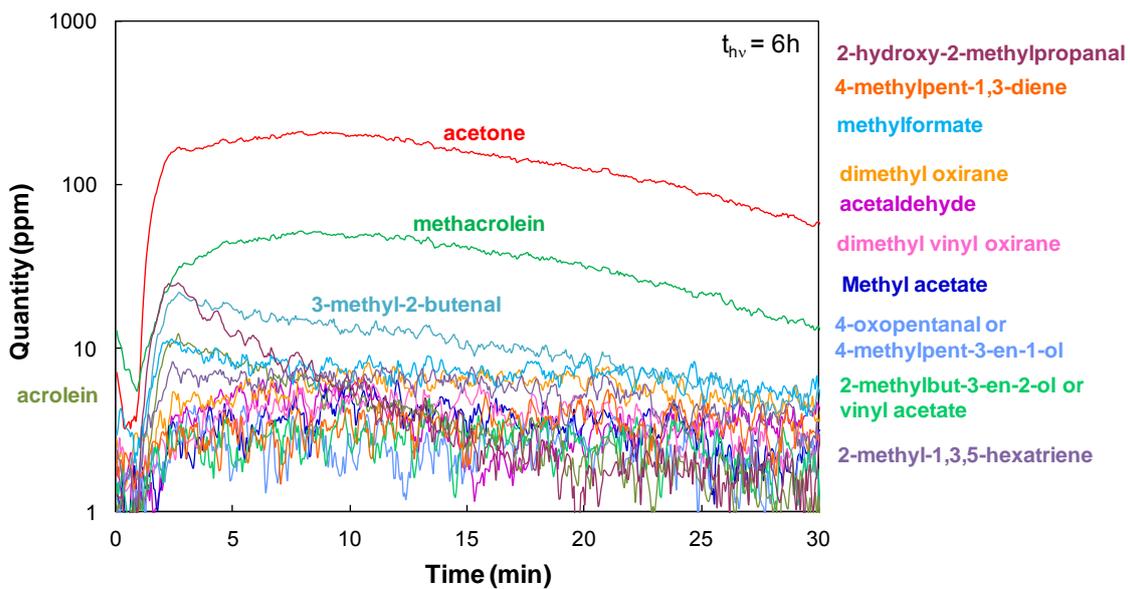
B-trap mass spectrometry



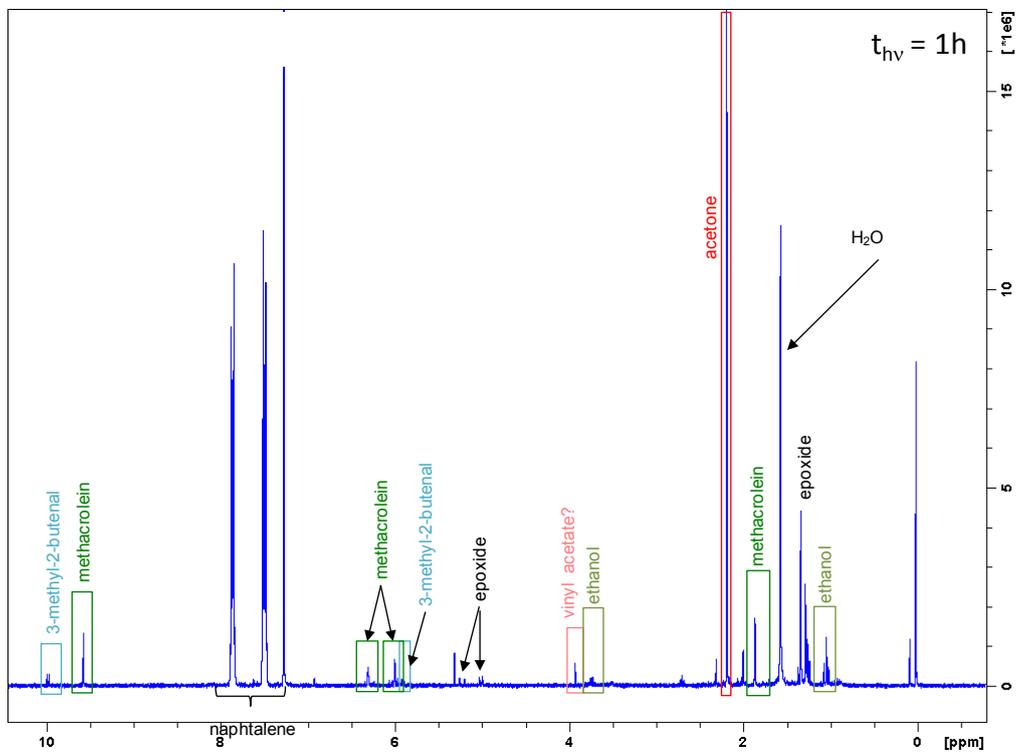
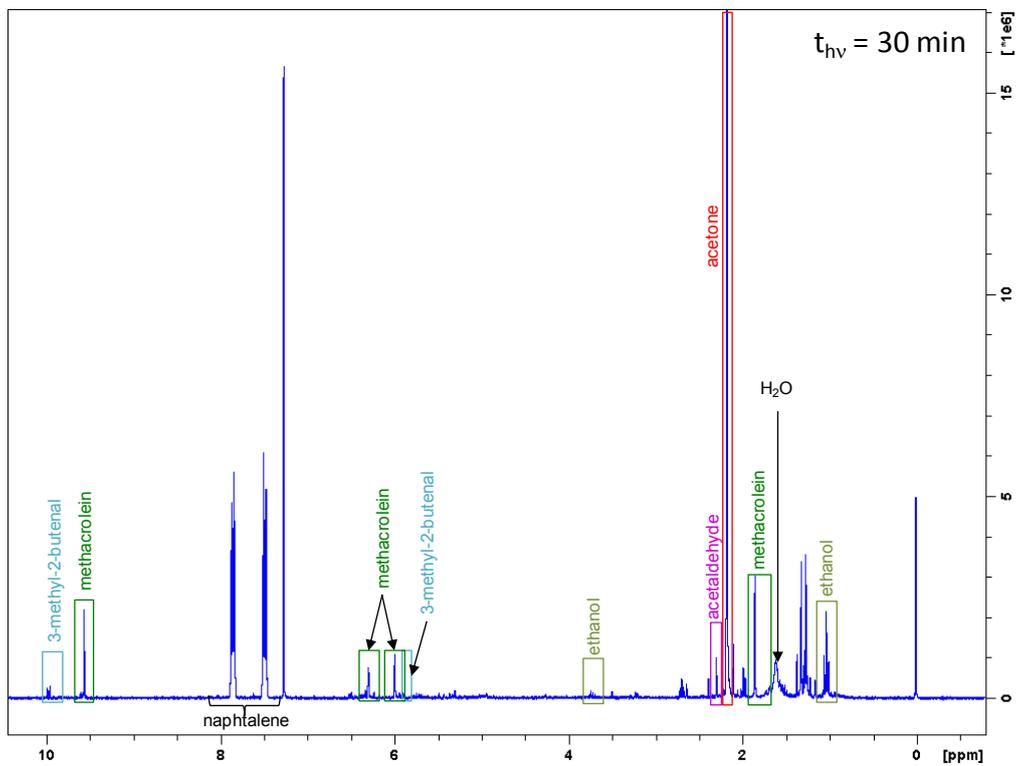
S2: Time profiles of the volatiles released from the SQ hydroperoxides

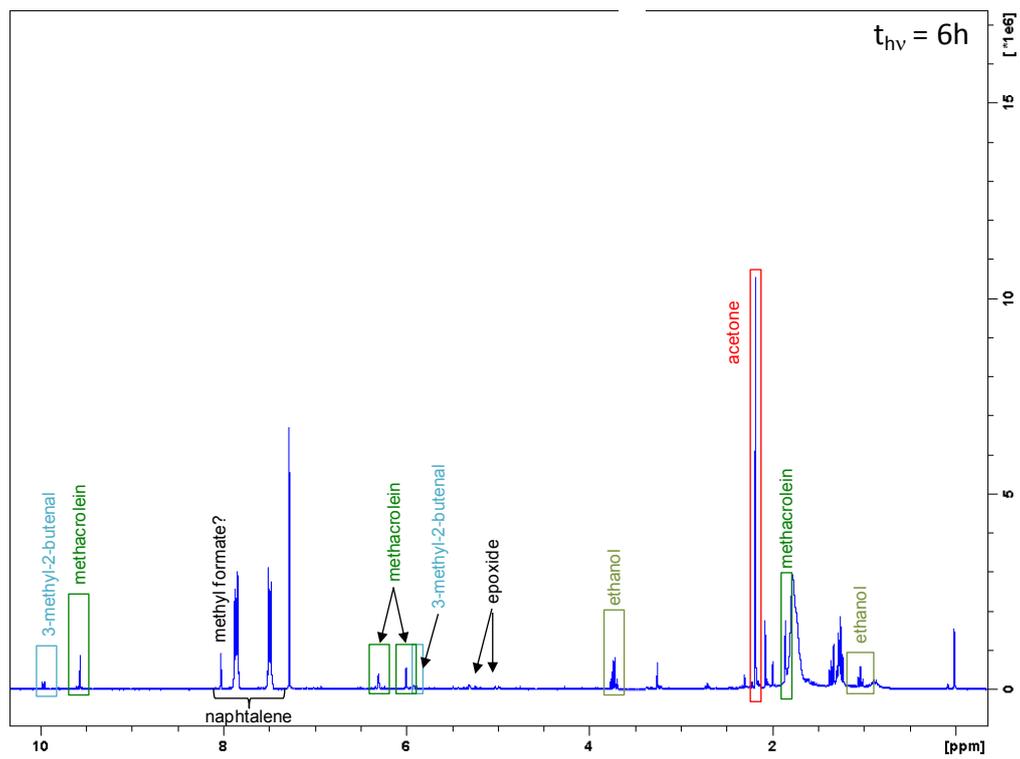
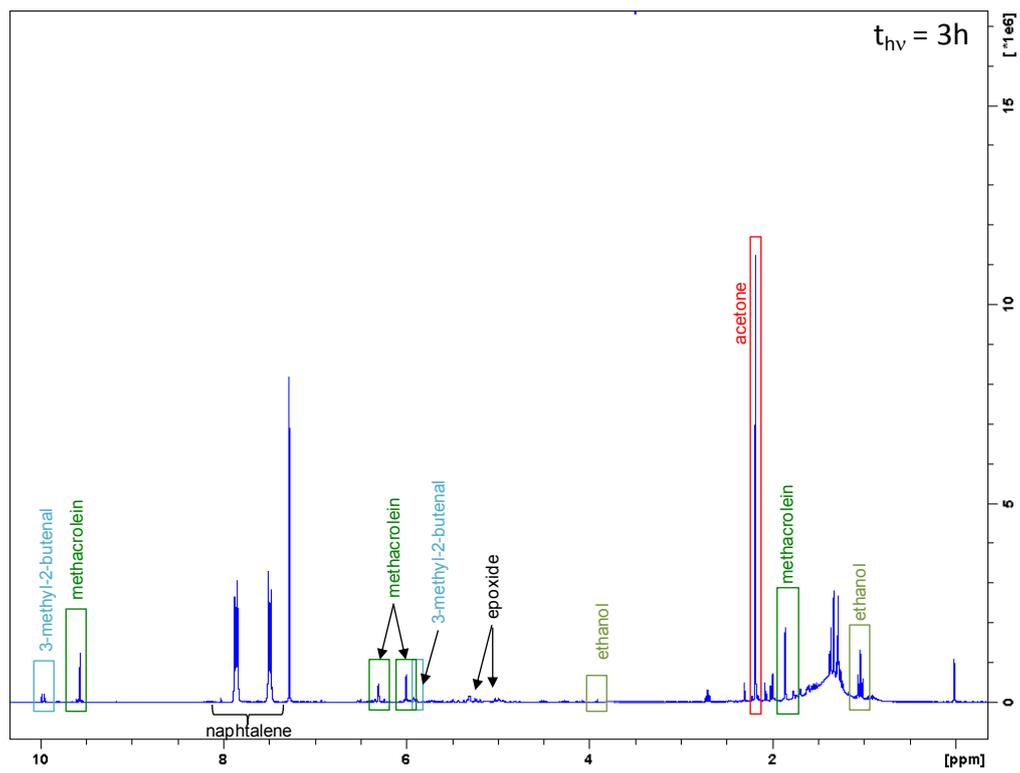


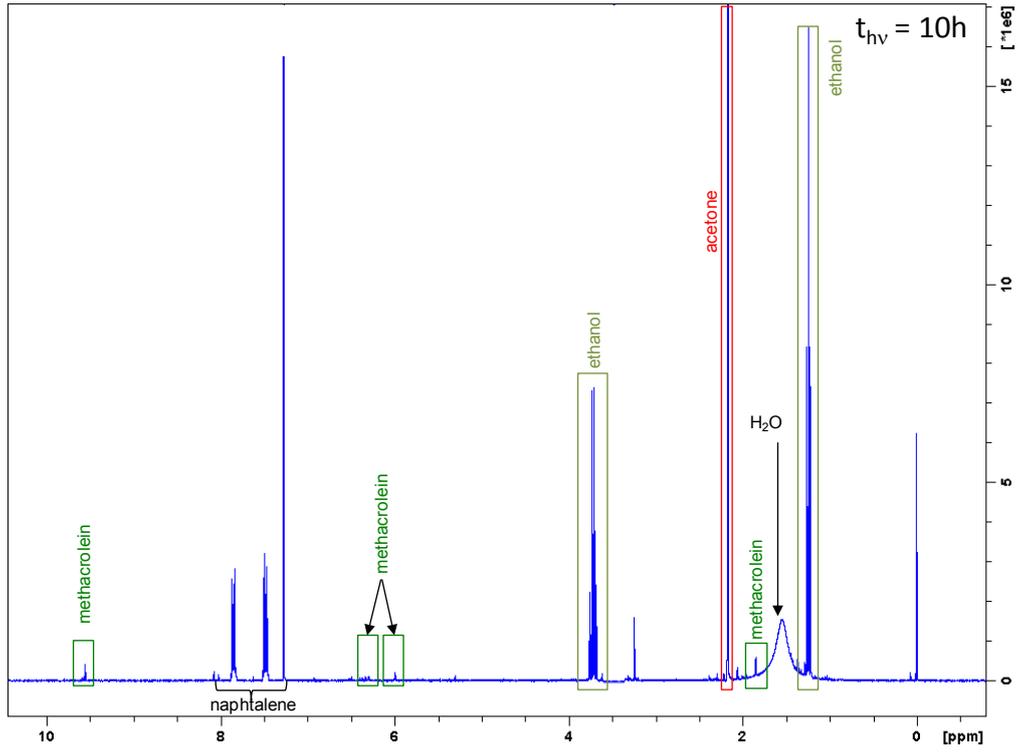




S2: ^1H NMR spectra of volatiles released from the thermal decomposition of squalene hydroperoxide isomers







Complément 1 : dégradation du squalène peroxydé suivie par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les peroxydes et plus particulièrement les hydroperoxydes sont des composés thermosensibles. Ainsi, les acides gras insaturés tels que les acides oléique, linoléique et linolénique,^{14,15} s'oxydent facilement en présence d'oxygène pour conduire à des intermédiaires peroxydés (produits d'oxydation primaires), lesquels se clivent par thermolyse en produits d'oxydation secondaires volatils telles que des cétones ou des aldéhydes responsables de l'odeur de rancissement caractéristique d'un phénomène de dégradation oxydante. Certains volatils, comme l'acroléine et le malonaldehyde, ont d'ailleurs été décrits pour leurs effets cancérigènes. Les produits les plus cités sont généralement les aldéhydes à courtes chaînes et les acides. Stein *et al.* ont reporté la formation d'alcane et d'alcènes courts comme produits minoritaires.¹⁶ Concernant les terpènes, très peu d'informations à propos des mécanismes de dégradation sont données dans la littérature. Dans cette partie complémentaire, nous décrirons une méthode que nous avons utilisée pour tenter de piéger et d'identifier les produits de dégradation dérivés du squalène oxydé par **SPME (Solid Phase MicroExtraction)** combinée à une détection CG-FID.

II.2.1.1. Calibration des temps de rétention en CG

Dans la littérature, les composés volatils de dégradation oxydante des acides gras insaturés^{14,15,17} sont des aldéhydes et des cétones, puis des acides à chaîne courte, le CO₂ et l'eau. Afin d'étudier les composés volatils issus de la décomposition des hydroperoxydes de squalène, nous avons tout d'abord cherché à établir une échelle de calibration en fonction des temps de rétention d'aldéhydes et de cétones commerciaux et pouvant être présent dans les mélanges de volatils étudiés. La figure 5 reporte l'échelle des temps de rétention en fonction des molécules sélectionnées.

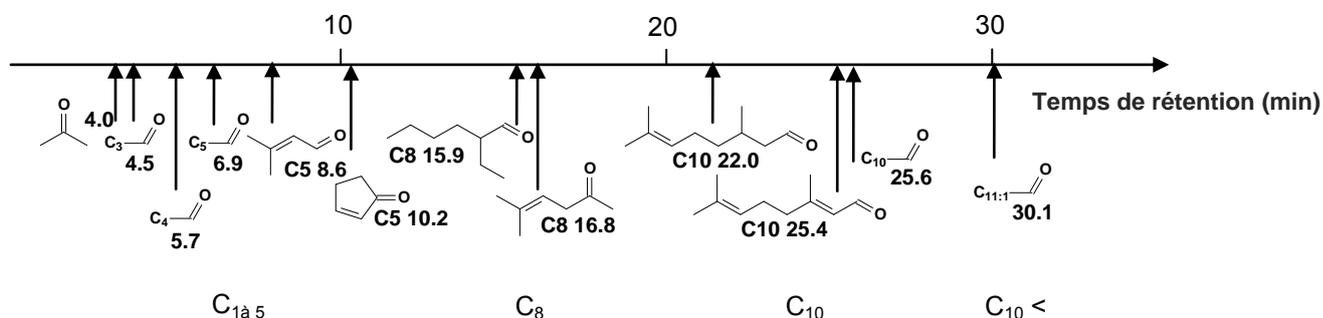


Figure 5. Temps de rétention en CG-FID d'aldéhydes et de cétones commerciaux.

Généralement, plus la masse moléculaire d'une molécule est élevée, plus son temps de rétention est élevé. La tendance sera la même en présence de ramifications ou d'insaturations. Grâce à cette

première calibration, il nous sera possible de faire une première estimation du nombre de carbones d'un composé inconnu par comparaison des temps de rétention.

II.2.1.2. La SPME (Solid-Phase MicroExtraction)

La SPME est une technique de préparation des échantillons développée au début des années 1990 à l'Université de Waterloo par le groupe du Dr. Pawliszyn.¹⁸⁻²⁰ Il s'agit d'une méthode simple et peu coûteuse qui ne nécessite pas l'utilisation de solvant.^{15,21} De plus, la limite de détection peut atteindre le ppm pour certains composés. Dans ce travail, une fibre recouverte de PDMS (PolyDiméthyl Siloxane) est utilisée comme phase d'extraction qui absorbe les molécules volatiles à température modérée (Figure 6). La SPME est piquée dans l'échantillon (1), puis la fibre est sortie et les molécules sont adsorbées (2). Une fois l'extraction terminée, la fibre est rentrée à nouveau dans la SPME, (3). La quantité de composés extraits est proportionnelle à la concentration de l'échantillon et à sa volatilité. Après l'extraction, la fibre de la SPME est transférée dans l'injecteur de la GC où se produit alors la désorption des composés à température élevée (4-6), et l'analyse des molécules piégées.

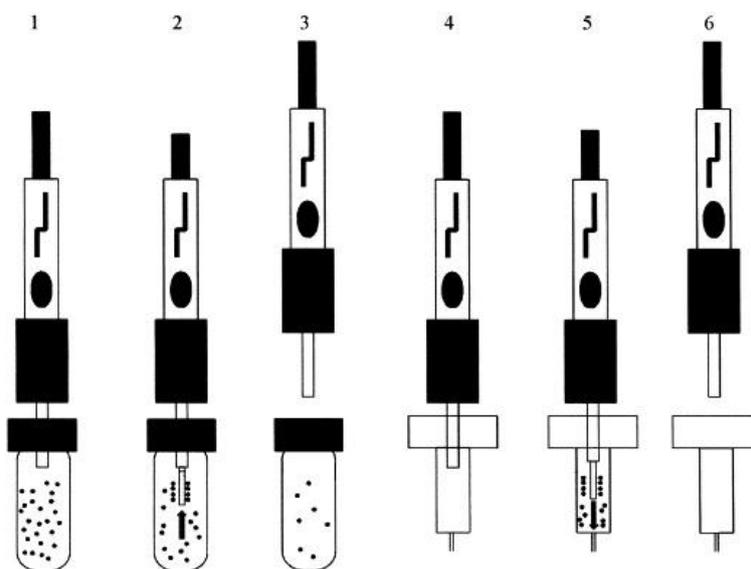


Figure 6. Représentation des phases d'absorption de 1 à 3 des COVs par la SPME et de désorption de 4 à 6 des COVs de la SPME dans l'injecteur de la GC.²²

II.2.1.3. Analyse « headspace » des produits de dégradation des $SQ(OOH)_n$

En raison de la thermosensibilité des hydroperoxydes de squalène, il n'est pas envisageable de les injecter directement en GC. Il nous a donc fallu mettre au point des techniques et méthodes pour

détecter et identifier les composés volatils issus de la décomposition thermique des hydroperoxydes de squalène qui, contrairement aux acides gras insaturés, libèrent une odeur agréable. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler sur un échantillon riche en isomères **SQ(OOH)₆** qui procure un maximum de volatils odorants.

Des pièces de tissus de 3 x 3 cm, en coton ou en polyester, fournies par la société Unilever ont été immergées dans une solution méthanolique de **SQ(OOH)₆** pendant un temps donné afin que les composés s'adsorbent sur le tissu. Les morceaux de tissu ont ensuite été ventilés pendant 1 heure puis séchés durant une nuit à l'abri de la lumière. La masse du tissu a été contrôlée avant et après la déposition de manière à déposer environ 16 mg de produit par cm². L'échantillon a alors été placé dans un vial fermé par un septum en téflon et une capsule en aluminium. La fibre de la SPME a ensuite été insérée à travers le septum de manière à prélever la phase gaz, riche en composés volatils libérés par les hydroperoxydes de squalène déposés sur le tissu, puis analysée en GC. Différentes conditions de décomposition ont été appliquées ; les résultats sont présentés dans le paragraphe suivant.

II.2.1.3.i. Dégradation des isomères de **SQ(OOH)₆**

La décomposition de l'échantillon de **SQ(OOH)₆** déposé sur du coton a été réalisée sous irradiation d'une lampe halogène (conditions des rayons du soleil) ou dans le noir, à 40 °C pendant 2 h. Des chromatogrammes similaires ont été obtenus.

En utilisant la calibration réalisée avec les produits commerciaux, il est possible de définir le nombre de carbones composant les produits volatils libérés. Nous observons deux pics majeurs proches de $t_r = 4$ min correspondant à des composés en C_{3,4}. Le composé à $t_r = 7,22$ min doit avoir une chaîne carbonée entre C₅ et C₆ et le pic à 14,37 min est probablement un composé en C₈. La similitude des spectres avec ou sans irradiation suggère fortement que la décomposition des hydroperoxydes de squalène est un processus thermique et non photochimique.

Le même échantillon a été également testé à plus haute température (60 °C) et à différents temps (1, 2 et 4h). Les chromatogrammes sont sensiblement les mêmes que précédemment, excepté que les pics détectés augmentent avec la température et le temps de chauffage. Finalement, les vials ont été ouverts et sentis. Une même odeur verte et boisée a été identifiée pour l'ensemble des échantillons, avec une variation de l'intensité de l'odeur en fonction des conditions de dégradation.

II.2.1.3.ii. Dégradation du squalène photooxydé à différents temps d'irradiation

La photooxydation du squalène a été réalisée pour différents temps d'irradiation (t_0 , 5 min, 30 min et 3h). Chaque milieu réactionnel a été concentré, sans retirer le Rose Bengale, puis déposé sur un morceau de tissu en coton ou polyester (3 x 3 cm). La thermo-dégradation a été réalisée dans un bain à 40 °C pendant 2h, à l'abri de la lumière.

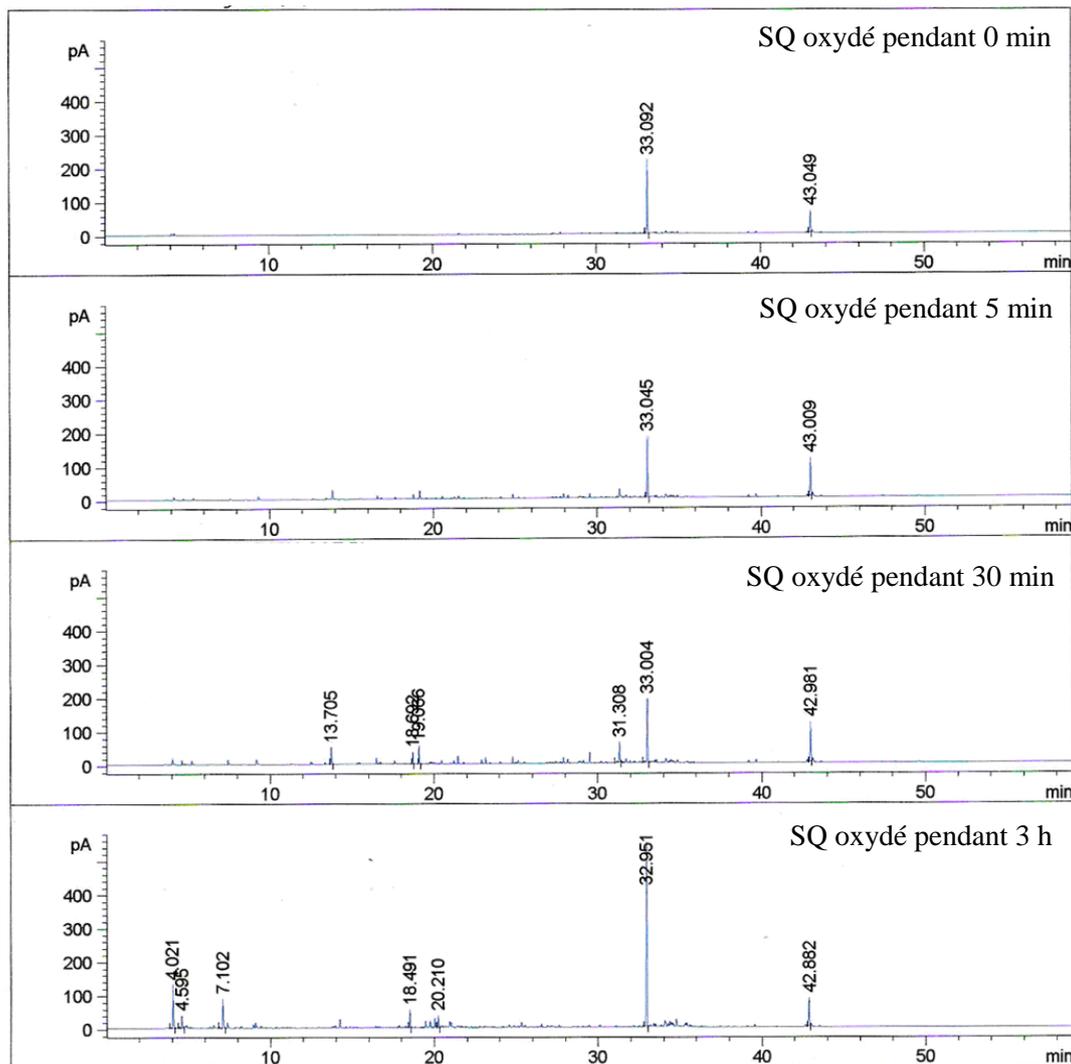


Figure 7. Chromatogrammes obtenus par SPME-CG du squalène photooxydé en présence de Rose Bengale, déposé sur un morceau de tissu en coton, puis chauffé à 40 °C pendant 2h, dans le noir. Les temps de photooxydation de chaque échantillon sont : **a)** 0 min, **b)** 5 min, **c)** 30 min, **d)** 3h.

Des chromatogrammes similaires ont été obtenus sur coton et sur polyester. Les résultats des échantillons sur coton sont présentés figure 7. Deux grands pics à $t_r = 33$ et 43 min sont présents sur tous les chromatogrammes, y compris sur celui provenant de la dégradation du Rose Bengale seul, préparé selon le même protocole. Bien que la concentration du sensibilisateur soit extrêmement faible (10^{-5} M), il se trouve tout de même être à l'origine des plus grands pics sur des chromatogrammes de dégradation.

En dehors des deux pics du sensibilisateur, nous n'observons quasiment pas de composés volatils à $t = 0$. Le nombre et l'aire des pics augmentent avec le temps d'irradiation de même que l'odeur des échantillons. Après 3h d'irradiation, avec ou sans rose Bengale, on obtient les mêmes

chromatogrammes, indiquant que celui-ci n'influence pas le processus de thermo-dégradation des **SQ(OOH)₆**.

Nous avons donc tenté une séparation des hydroperoxydes de squalène pour aller plus loin dans l'identification de l'influence du degré d'oxydation. Pour cela, la réaction a été stoppée après 30 min d'irradiation et contenait donc SQ et **SQ(OOH)₁₋₄**. Sur le principe de la CCM, trois fractions ont été séparées et analysées. Les deux premières fractions contenaient du **SQ(OOH)₁**, majoritaire, et du **SQ(OOH)₂**. Les tests de décomposition des hydroperoxydes sur morceau de tissu en coton ont été réalisés sur ces deux fractions ainsi que sur le mélange après 30 min d'irradiation (22 mg.cm⁻² de coton).

Les deux premières fractions correspondant aux deux premiers degrés de peroxydation du squalène ne fournissent quasiment pas de pics. Le mélange obtenu après 30 min d'irradiation, se décompose en un nombre important de produits, tandis que l'odeur caractéristique du squalène oxydé est retrouvée. Nous pouvons ainsi conclure que la décomposition des hydroperoxydes de squalène en volatils odorants commence à partir du trihydroperoxyde du squalène.

Complément 2 : Analyse des résidus par DOSY

Une fois les hydroperoxydes dégradés thermiquement, un résidu collant, polymérisé, subsiste quelque soit le degré de peroxydation du squalène. La décomposition des hydroperoxydes suit un processus radicalaire, par des radicaux alcoyles RO[•] ou peroxydes ROO[•], initié par la température.²³ La propagation de cette réaction en chaîne peut entraîner le clivage des peroxydes mais également une polymérisation due à la présence de doubles liaisons le long de la chaîne carbonée du squalène peroxydé. Des liaisons covalentes peuvent alors se créer entre les **SQ(OOH)_n** et les fibres du coton, ce qui peut accroître la résistance du squalène au lavage.^{24,25} Chi *et al.*²⁵ ont mis en évidence que l'interaction du squalène sur les fibres de polyester était de nature physique plus que chimique, notamment par un maintien dans les interfibres capillaires du fil. Sur du coton ou du nylon, le squalène se trouve alors lié par des liaisons covalentes au textiles qui contiennent des groupements – OH ou amide.

Afin d'étudier la composition du résidu, la thermolyse des hydroperoxydes de squalène a été réalisée, directement dans un vial en verre, à 80 °C pendant 4h. Le film polymérique formé a été récupéré dans 600 µL de CDCl₃ et analysé par RMN. L'expérience ¹H a permis de valider qu'il s'agissait bien d'un polymère (figure 8).

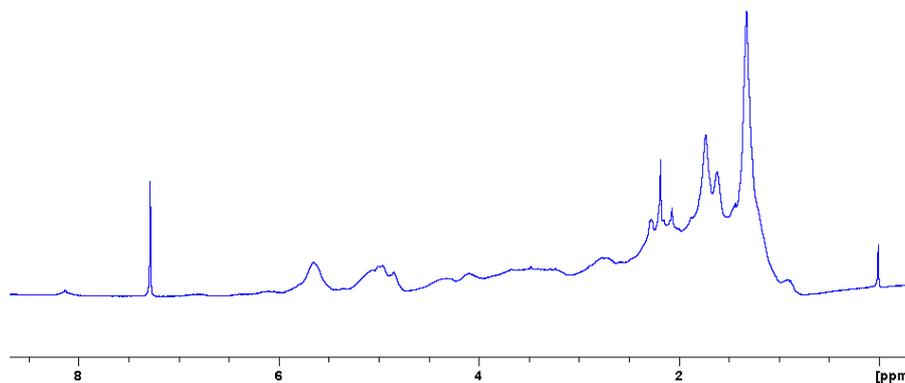


Figure 8. Spectre ^1H RMN des résidus issus de la thermolyse des $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ à $80\text{ }^\circ\text{C}$ durant 4h.

Afin d'obtenir une idée de la masse molaire de ce nouveau composé formé, une expérience par RMN DOSY a été réalisée. Ce type de séquence permet une représentation en deux dimensions et une séparation virtuelle en fournissant un spectre bidimensionnel avec en abscisse les déplacements chimiques en ppm et en ordonnées les coefficients de diffusion. Le DOSY présente l'avantage d'une différenciation, grâce aux coefficients de diffusion, de molécules dont les signaux sont susceptibles d'être superposés.

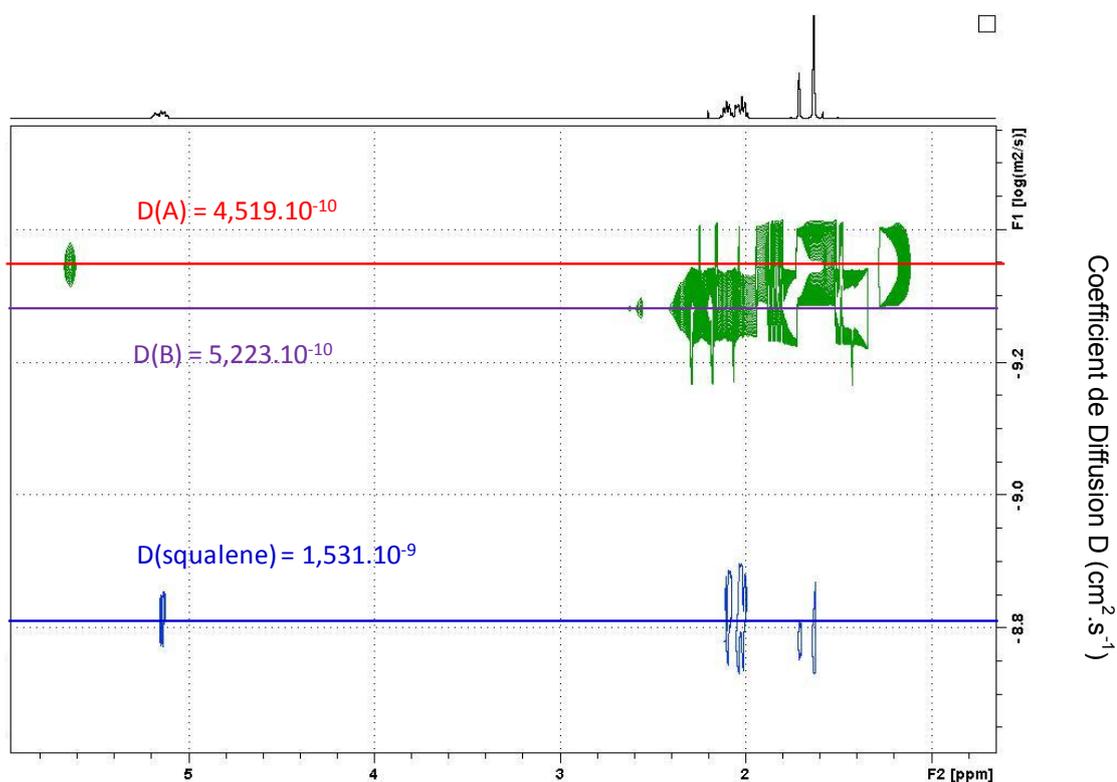


Figure 9. Comparaison des spectres DOSY obtenus pour le squalène (en bleu) et pour le résidu polymérique (en vert) issu de la dégradation thermique de $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ pendant 4h à $80\text{ }^\circ\text{C}$.

En 2000, Timmerman *et al.* ont développé une relation utilisant les coefficients de diffusion obtenus par l'expérience DOSY afin de calculer un ordre de grandeur de la masse molaire des composés.²⁶

$$\sqrt[3]{\frac{[M_i]}{[M_j]}} \leq \frac{[D_j]}{[D_i]} \leq \sqrt{\frac{[M_i]}{[M_j]}} \quad (2.1)$$

Cette formule est destinée à des molécules sphériques. Pour qu'elle puisse s'appliquer, il est nécessaire que les composés présentent des coefficients de diffusion assez différents mais une structure similaire. La figure 9 montre la comparaison des spectres DOSY obtenus pour le squalène et pour le résidu. On peut clairement voir en vert que le résidu est composé de deux polymères de masse molaire et de structures similaires. Ces deux macromolécules seront nommées A (en rouge) et B (en violet). La différence majeure entre A et B résulte en la présence d'insaturations dans le composé A, visibles par une tache comprise entre 5 et 6 ppm, ce qui n'est pas le cas du polymère B. La différence entre le coefficient de diffusion du squalène et celui des polymères A et B est suffisamment importante pour pouvoir appliquer l'inégalité, à condition d'émettre l'hypothèse que le polymère présente une conformation sphérique en solution. Ainsi on peut déterminer que la masse moléculaire de A est comprise entre 4720 et 16 000 g.mol⁻¹ et celle de B se situe entre 3526 et 10 332 g.mol⁻¹. Sur la figure 10, nous avons émis l'hypothèse d'une possible structure du polymère formé lors de la thermolyse des hydroperoxydes de squalène.

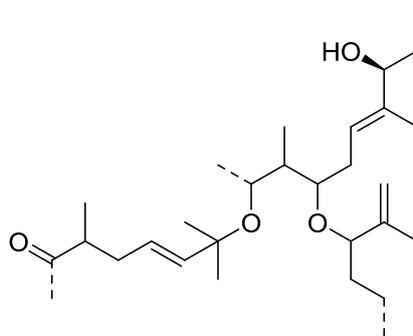


Figure 10. Hypothèse de structure de la macromolécule issue de la thermolyse des $SQ(OOH)_n$.

L'importance de l'inégalité illustre les limites de cette formule dans le cas de l'étude des résidus issus de la thermolyse du squalène peroxydé. Ainsi, la disparité des résultats peut être expliquée par la non sphéricité des composés étudiés. D'autres techniques analytiques seraient nécessaires et plus appropriées pour l'étude des résidus telle que la spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) par exemple. Cependant, dans le cadre de ces travaux de recherche, il ne nous a pas été possible de les réaliser dans le temps imparti de la thèse étant donnée la nécessité de faire appel à des laboratoires extérieurs.

Références :

14. T.O. de Silva, P.A. Pereira., Influence of time, surface-to-volume ratio, and heating process (continuous or intermittent) on the emission rates of selected carbonyl compounds during thermal oxidation of palm and soybean oils. *J. Agric. Food Chem.* **2008.** *56*, 3129-3135.
15. M. C. Garcia-Martinez, G. Marquez-Ruiz, J. Fontecha, M. H. Gordon, Volatile oxidation compounds in a conjugated linoleic acid-rich oil. *Food Chem.* **2009.** *113*, 926-937.
16. R. A. Stein, J. F. Mead, Small hydrocarbons formed by the peroxidation of squalene. *Chem. Phys. Lipids*, **1988.** *49*, 117-120.
17. G. Procida, A. C. D. Compagnone, R. M. Maggio, L. Cerretani, M. D. Carlo, Influence of chemical composition of olive oil on the development of volatile compounds during frying. *Eur. Food Res. Technol.* **2009.** *230*, 217-229.
18. Z. Zhang, J. Pawliszyn, Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **1993.** *65(14)*, 1843-1852.
19. A. A. Boyd-Boland, M. Chai, Z. Luo Yu, Z. Zhang, M. J. Yang, J. B. Pawliszyn, T. Gorecki, New solvent-free sample preparation techniques based on fiber and polymer technologies. *Envir. Sci. Tech.* **1994.** *28(13)*, 569A-574A.
20. C. L. Arthur, L. M. Killam, P. J. Buchholz, D. Karen, R. Berg John, Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **1992.** *64(17)*, 1960-1966.
21. G. Gallet, S. Carroccio, P. Rizzarelli, S. Karlsson, Thermal degradation of poly(ethylene oxide-propylene oxide-ethylene oxide) triblock copolymer: comparative study by SEC/NMR, SEC/MALDI-TOF-MS and SPME/GC-MS. *Polymer*, **2002.** *43(4)*, 1081-1094.
22. S. Ulrich, Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr. A*, **2000.** *902(1)*, 167-194.
23. K. M. Schaich, Lipid Oxidation: Theoretical Aspects, in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. **2005**, John Wiley & Sons, Inc.
24. Y. S. Chi, S. Kay, Obendorf, Aging of oily soils on textiles. Chemical changes upon oxidation and interaction with textile fibers. *J. Surfactants Deterg.*, **1998.** *1(3)*, 371-380.
25. Y. S. Chi, S. K. Obendorf, Aging of oily soils on textile materials: A literature review. *J Surfact Deterg*, **1998.** *1(3)*, 407-418.
26. P. Timmerman, J.-L. Weidmann, K. A. Jolliffe, L. J. Prins, D. N. Reinhoudt, S. Shinkai, L. Frish, Y. Cohen, NMR diffusion spectroscopy for the characterization of multicomponent hydrogen-bonded assemblies in solution. *Perkin 2*, **2000**, 2077-2089.

Chapitre III

**Peroxydation des Terpènes et Terpénoïdes,
sous-structures du Squalène, et Dégradation
Thermique des Hydroperoxydes**

Introduction

La dégradation oxydante du squalène met en jeu des systèmes complexes requérant des méthodes et des techniques analytiques adaptées. Aussi, afin de nous aider dans notre démarche visant à détecter et identifier les molécules formées lors de l'oxydation et de la décomposition des hydroperoxydes, nous avons également recensé et étudié un certain nombre de sous-structures du squalène, commercialement disponibles ou facilement synthétisables. Une démarche similaire avait déjà été utilisée dans le cadre de travaux sur le polyisoprène.^{1, 2} Les sous-structures que nous avons choisies sont des composés mono-, di- ou tri- insaturés, de type terpènes ou terpénoïdes, majoritairement issus des végétaux et largement utilisés comme fragrances en parfumerie. Le tableau 1 reporte les composés retenus, tous comportant le même motif terminal, dérivé de l'isoprène, que le squalène.

N°	Substrat	Structure chimique
1a	2,6-diméthyl-2-octène	
1b	acétate de citronellyle	
1c	stéarate de citronellyle	
monoterpènes		
2a	2,6-diméthyl-2,6-octadiène	
2b	acétate de géranyle	
2c	stéarate de géranyle	
sesquiterpènes		
3a	2,6,10-triméthyl-2,6,10-dodécatriène	
3b	acétate de farnésyle	
3c	stéarate de farnésyle	

Tableau 1 : Molécules identifiées comme sous-structures du squalène et étudiées dans le cadre de la compréhension des mécanismes de dégradation oxydante du squalène.

Nous avons ainsi retenu 9 molécules dont des acétates, des stéarates et des terpènes mono-, di- et tri-substitués. Les 2,6-diméthyl-2-octène **1a**, 2,6-diméthyl-2,6-octadiène **2a** et 2,6,10-triméthyl-2,6,10-dodécatriène **3a**, bien que commercialement disponibles mais excessivement chers, ont été synthétisés par réduction des alcools correspondants.

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels basés sur la combinaison d'unité isoprène. Les terpénoïdes sont des terpènes présentant un ou plusieurs atomes d'oxygène. Ils constituent entre autre le principe odoriférant des végétaux grâce à leur grande volatilité. La bibliométrie succincte que nous avons réalisée figure 1 illustre bien que leurs applications résident dans la composition complexe de produits industriels. Naturellement présents dans les huiles essentielles, ils se retrouvent dans la composition des parfums mais également dans celle de produits cosmétiques. Ils peuvent également être utilisés dans l'alimentaire comme arôme. Contrairement au squalène où la biochimie transparaît comme un secteur majeur ici elle ne représente qu'1% des études, bien que ces substrats soient extraits des végétaux. En effet, le citronellol est obtenu par distillation des essences de géranium et de citronnelle, le géraniol est composant majeur de l'huile de rose et de palmarosa et le farnésol est extrait des huiles essentielles de camomille et de palmarosa. Cependant, ils ne représentent pas des réactifs majeurs des métabolismes végétaux.

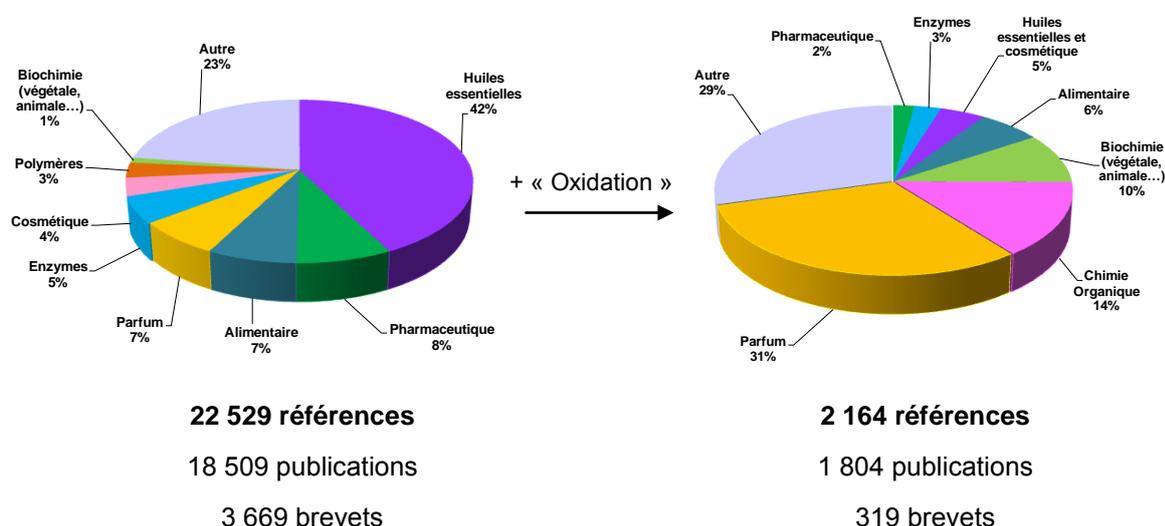


Figure 1 : Analyse bibliométrique par secteurs, réalisée sur Scifinder[®], des documents relatifs aux terpènes et terpénoïdes sous-structures du squalène. La recherche a été réalisée à base des CAS de chacun des composés étudiés dans ce chapitre puis affinée en leur associant le mot clé 'oxydation'.

Bien que ce soient pour la plupart des composés d'origine naturelle ou leurs dérivés, les terpènes et les terpénoïdes n'en sont pas pour autant moins dangereux. Ils peuvent être irritants voir allergènes, notamment lorsqu'ils sont oxydés.³⁻⁵ Ainsi 10% des documents concerne leur oxydation et en particulier dans le domaine des parfums avec 31% des publications et des brevets confondus. Ces substrats insaturés servent également de réactifs notamment pour la préparation de cétones ou d'aldéhydes par oxydation d'alcool.^{6,7}

Comme pour le chapitre II, le chapitre III se présente sous la forme d'une publication dans laquelle nous avons regroupé cette fois l'oxydation et la dégradation car un certain nombre des molécules retenues a déjà fait l'objet d'études similaires. Les substrats du tableau 1 ont donc été oxydés par l'oxygène singulet engendré par voies chimique et photochimique et les hydroperoxydes formés ont été détectés et identifiés en, recourant à des techniques de spectroscopies RMN et ESI-SM et à la chromatographie CLHP. La dégradation thermique des hydroperoxydes a été suivie en temps réel et quantifiée par un spectromètre de masse B-trap, développé par la société AlyXan, située à Orsay. En réalité, ces composés ont été étudiés simultanément avec le squalène. Cependant, ayant choisi de présenter les résultats sous forme de publications, nous avons préféré différencier les données obtenues pour le squalène et celles des dérivés terpéniques.

L'objectif de cette étude est de développer des techniques analytiques permettant la détection et l'identification des produits issus de la dégradation des hydroperoxydes et les mécanismes associés. En effet, il est nécessaire aujourd'hui de connaître autant la composition initiale d'un produit que celle résultant de l'instabilité de certains ingrédients, entraînant la formation de produits primaires et secondaires, parfois dangereux.

Références

1. C. Tanielian, J. Chaineaux, Sensitized photo-oxidation of polyisoprene: effect of the presence of hydroxy and hydroperoxy groups. *Eur. Polym. J.*, **1980**. *16*(7): 619-622.
2. C. Tanielian, R. Mechin, Reactions of singlet oxygen with polyisoprene and model compounds. *Tetrahedron*, **1985**. *41*(11): 2139-2146.
3. L. Hagvall, C. Bäcktorp, S. Svensson, G. Nyman, A. Börje and A.-T. Karlberg, Fragrance Compound Geraniol Forms Contact Allergens on Air Exposure. Identification and Quantification of Oxidation Products and Effect on Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.*, **2007**. *20*(5): 807-814.
4. C. Backtorp, L. Hagvall, A. Borje, A.-T. Karlberg, P.-O. Norrby and G. Nyman, Mechanism of Air Oxidation of the Fragrance Terpene Geraniol. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **2007**. *4*(1): 101-106.
5. M. Bezard, A.-T. Karlberg, J. Montelius and J.-P. Lepoittevin, Skin Sensitization to Linalyl Hydroperoxide: Support for Radical Intermediates. *Chem. Res. Toxicol.*, **1997**. *10*(9): 987-993.
6. T. Nishii, Ouchi T., Matsuda A., Matsubara Y., Haraguchi Y., Kawano T., Kaku H., Horikawa M. and T. T., Modified Markó's aerobic oxidation of alcohols under atmospheric pressure with air or molecular oxygen at room temperature. *Tetrahedron Lett.*, **2012**. *53*(44): 5880-5882.
7. B. M. Trost, M.Y., Molybdenum catalyzed reactions. Selectivity in oxidations with hydrogen peroxide and ammonium molybdate. *Isr. J. Chem.*, **1984**. *24*: 134-43.

MS-FTICR analysis of volatiles released by thermolysis of singlet oxygenated terpenoids

Delphine BLONDE¹, Stéphanie DELBAERE², Caroline TOKARSKI³, Craig JONES⁴, Véronique NARDELLO-RATAJ^{1*}, Jean-Marie AUBRY^{1*}

¹ *Université Lille Nord de France, EA 4478 Chimie Moléculaire et Formulation, Cité scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France*

² *Faculté des sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de physique et d'application RMN, 3 rue du professeur Laguesse, BP 83, 59006 Lille cedex, France*

³ *Université Lille Nord de France, MSAP USR 3290, 59652 Villeneuve d'Ascq, France*

⁴ *Unilever PLC, Port Sunlight Laboratory, Bebington, Wirral CH63 3JW, United-Kingdom*

Abstract:

A series of secondary and tertiary hydroperoxides are prepared by reaction of twelve terpene olefins and esters with chemically ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{MoO}_4$) or photochemically ($^3\text{O}_2/\text{hv}/\text{sensitizer}$) generated singlet oxygen. They are analyzed as such by both NMR and nanoESI-Qq-TOF MS after cationisation with lithium chloride. The volatile organic compounds evolved during their thermolysis are analyzed in real time using proton transfer reaction associated with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (MS-FTICR). The percentage of volatiles released varies between 5% and 80% depending on the temperature (80 or 100°C), the number of hydroperoxide groups and the chemical structure of the starting terpenoid. In all cases, acetone is the main compound formed and it is accompanied by variable amounts of methacrolein, pent-4-en-2-one, 2-methylbut-3-en-2-ol, 3-methylbut-3-en-2-ol and acetic acid. The formation of these compounds is rationalized in terms of a homolytic cleavage of the hydroperoxide RO-OH bond followed by alpha- and beta-scission of alkoxy radicals.

Keywords:

Hydroperoxides, terpenoids, singlet oxygen, thermolysis, volatile organic compounds, MS-FTICR, fragrances

I- INTRODUCTION :

Terpenoids are the largest class of natural compounds, they are ubiquitous in all types of living organisms as well as in many every day consumer products including fragrances, cosmetics, soaps, food and detergents. They are often utilized to give a product a pleasant scent but they may also induce adverse health effects. Actually, fragrances are the second most common cause of skin allergy which may be triggered by the fragrance (muscs) itself. However, most terpenic compounds are weak allergens, but many of them (limonene, geraniol, linalool), forms strong allergens when exposed to air.¹⁻³

Actually, most terpenes and terpenoids contains electron-rich double bonds which easily undergo autoxidation with molecular dioxygen to yield, in the first step, hydroperoxides. On rare occasions, these hydroperoxides are valuable starting materials in fine chemistry. For instance, citronellol hydroperoxides are key intermediates in the synthesis of rose oxide on an industrial scale.⁴⁻⁶ However, most of the time, hydroperoxides cause adverse effects since they are themselves strong allergens. In addition, these unstable compounds suffer homolytic breakdown on thermolysis, photolysis or catalysis by metal traces, generating transient oxygenated radicals and, finally, a complex mixture of degradation products (epoxides, acroleins, aldehydes, acids, alcohols, ketones) among which harmful compounds may be found.⁷⁻⁹ In the case of perfume molecules, this oxidative degradation may lead to alteration or disappearance of the olfactory notes and to the appearance of unpleasant smells, unwanted colours besides allergenic reactions.³ As for squalene, a triterpene which is a major component of sebum, its autoxidation leads to a mixture of hydroperoxides likely to induce hyperpigmentation of the skin and scalp irritation. With the new regulations imposed by the program REACH, it is not only required to control the safety and the stability of the starting ingredients but also those of final formulations. Therefore, it is necessary to develop analytical methods able to detect and identify harmful degradation products, which can sometimes be present in trace amounts.

In this work, we report a detailed analytical and mechanistic study of the formation and thermal decomposition of hydroperoxides from twelve terpenoids, carrying one to three double bonds. Hydroperoxides are prepared using chemical or photochemical sources of singlet oxygen and then analyzed by NMR and ESI-Li⁺. In a second step, the volatile compounds formed during their thermolysis are either trapped in cold CDCl₃ and studied by NMR spectroscopy, or analyzed in real time using MS-FTICR.

II- MATERIAL AND METHODS

Materials

β -Citronellol **1** (98%), citronellyl acetate **1b** (>80%), geraniol **2** (>98%), geranyl acetate **2b** (98%), farnesyl acetate **3b** (95%) bengal rose sodium salt (> 90%), tetraphenylporphyrin (99%), sodium molybdate (99%), methylene chloride (>99.8%) and farnesyl acetate (98%) are purchased from Sigma-Aldrich. Farnesol **3** (95%) is from Alfa Aesar. Acetone (99.5 %) is obtained from Verbieste and methanol (>99.8%) from SDS. Triethylamine (99%) is from Sigma Aldrich, sulfur trioxide pyridine complex (98%) from Sigma Aldrich and LiAlH_4 (95%) from Sigma Aldrich. Magnesium sulfate (99.5%) came from Alfa Aesar. Diethyl ether (99.5%) is purchased from Carlo Erba and THF (>99.5%) from Acros Organic. Tosyle chloride (>99%) is obtained from Acros organic and stearyle chloride (97%) is from Sigma Aldrich. The molecular models 2,6-dimethyl-2-octene **1a**, 2,6-dimethyl-2,6-octadiène **2a** and 2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodecatriene **3a**, and the terpenoid stearyles **1-3c** are synthesized according to the procedures of Krishnamurthy,¹⁰ Corey,¹¹ and Gascon.¹² respectively (Supporting information S1 and S2)

Singlet oxygenation of terpenoids

Photosensitized oxidation. A solution of the terpenoid ($3 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) and tetraphenylporphyrin (8 mg, $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) in CH_2Cl_2 (40 mL) is introduced in a cell maintained at 5°C with a water thermoregulated water bath. The solution is irradiated with a Philips Master SON-PIA 150W sodium lamp while maintaining a continuous bubbling of O_2 . The progress of the reaction is monitored by HPLC coupled with a UV detector. Terpenoid hydroperoxides are collected by solvent evaporation.

Catalytic oxidation with the system $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$.^{13, 14} A methanolic solution (5 mL) of the terpenoid ($3 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) and sodium molybdate ($5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) is treated with 60 μL (0.2 mol.L^{-1}) of 50% H_2O_2 . The red-brown solution is stirred at 20°C until the color faded to gold-yellow. Nine other fractions of H_2O_2 (60 μL) are allowed to react in the same way. The fading of red-brown to the gold-yellow color is the signal for an additional fraction of H_2O_2 . The reaction is monitored by HPLC. When the substrate is completely oxidized, the solvent (methanol) is rotary evaporated at 40°C in vacuum. The hydroperoxides are recovered by extracting the residue with 10 mL of cold CH_2Cl_2 . After centrifugation of the suspension, the supernatant organic phase is rotary evaporated at 20°C giving hydroperoxides.

Hydroperoxides analysis

Hydroperoxide reduction into alcohol and GC-FID analysis. The terpenoid hydroperoxides (5 mg) are solubilized in 1 mL of diethyl ether in which 5 equivalents of triphenylphosphine ($2 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$) are added. The solution is stirred during one hour at room temperature and the resulting alcohols are analyzed by injecting 1 μL through PTV in a GC-FID apparatus (Agilent 6890 N) equipped with a HP-1

(30 m, id : 0,32 mm, 0,25 μm) column. Column temperature program: 40°C (5 minutes), 3°C.min⁻¹ to 220°C. Ion source temperature: 200°C.

HPLC-UV. The HPLC instrument is a Shimadzu LC-20 AT with a UV detector (UVSPD20A) set at 210 and 240 nm. The hydroperoxide solution (500 μL) is injected onto a C18 column GRACE (250 mm x 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase is acetonitrile, methanol, water or a mixture of two of them at 1 mL.min⁻¹. (Supporting information S4)

NMR. Spectra of hydroperoxides are recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer equipped with a gradient-field TXI probe (300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C). The sample is dissolved in 0.6 mL of CDCl₃ and a small amount of naphthalene as an internal standard. (Supporting information S5)

*Nano ESI-Qq-TOF MS analysis of hydroperoxides.*¹⁵ The hydroperoxides samples (100 fmol/ μL), diluted in acetonitrile are cationized using lithium chloride solution (0.02% final). The samples are analyzed with a Q-star Pulsar mass spectrometer (Perseptive biosystems, Framingham, MA, U.S.A.). The FT-ICR mass spectrometer is equipped with a nano-electrospray source. Detection is carried out in positive mode. A potential of 1.3 kV is applied on a metal coated needle. Ions are selected in the first quadrupole, collided with Ar in the R_F-only second quadrupole using collision energy and analyze in the time-of-flight analyze (TOF).

Hydroperoxides thermolysis and VOC analysis

Hydroperoxide weight loss. The terpenoid hydroperoxide (100mg) is deposited onto a glass Petri dish and introduced into an oven heated at 80°C. During the first day, weighings are done every 2 hours, then once a day for a week.

Trapping of volatiles emitted through thermolysis of hydroperoxides; NMR analysis. Isolated terpenoid hydroperoxide (100mg) is introduced into a glass flask maintained at 80°C with a water bath. Volatile compounds are carried off with an argon stream and trapped into a 1.5 mL GC vial, cooled at -8°C, and containing CDCl₃ (500 μL) and naphthalene (10⁻³ mol.L⁻¹) as internal standard.

*Real-time MS-FTICR (Mass Spectroscopy of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance).*¹⁶

The experimental setup is schematized in figure 1. The sample is introduced into an oven and swept by a controlled air flow, which is continuously sampled by a mass spectrometer.

The oven temperature is stabilized to 100°C. 100 mg of hydroperoxide sample are put in a small quartz vessel and introduced into the preheated oven. A continuous nitrogen or air flow is driven through the oven. For all the experimental the flow is 100 mL/min. The transfer line is continuously heated at 100°C. A part of the outlet flow is taken through the leak valve, which is adjusted to reduce the gas pressure to a few Torr. A second stage of pressure reduction is made by a dimensioned capillary tube (0.02 in. i.d.) being heated, allowing the appropriate pressure of 4 x 10⁻⁵ Torr in the cell to be reached. The capillary tube is continuously heated to avoid condensation.

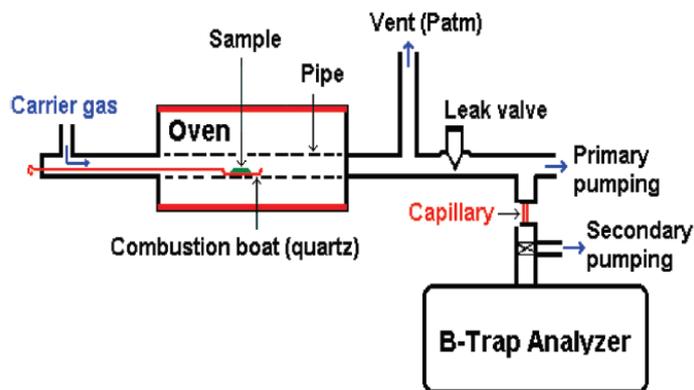


Figure 1. Experimental setup for real time analysis of VOCs emitted from hydroperoxide thermal degradation

The succession of precursor ion preparation, chemical ionization reaction, and ion detection leading to the mass spectrum is carried out according to the typical programmed operating sequence below

- (1) Introduction of H₂O steam (a few 10⁻⁶ Torr)
- (2) Electron ionization of H₂O
- (3) Reaction time for H₃O⁺ formation
- (4) Introduction of the neutral sample (a few 10⁻⁵ Torr)
- (5) Detection of signal
- (6) Ion quench. All the ions in the cell are ejected for the next sequence

III- RESULTS AND DISCUSSION

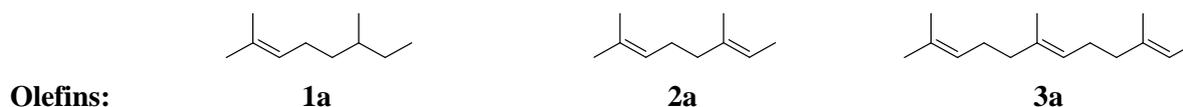
A series of terpenoids are chemically and photochemically peroxidised by singlet oxygen at temperature lower than 20°C in order to preserve the integrity of the formed hydroperoxides. These unstable compounds are then thermally decomposed to mimic the oxidative degradation of fragrances kept under aerobic conditions. Finally, the mechanisms underlying the release of volatile compounds are discussed on the basis of the possible rearrangements of the alkoxy radicals RO. resulting from the homolytic cleavage of the RO-OH bond.

A- Preparation of terpenes hydroperoxides by singlet oxygenation

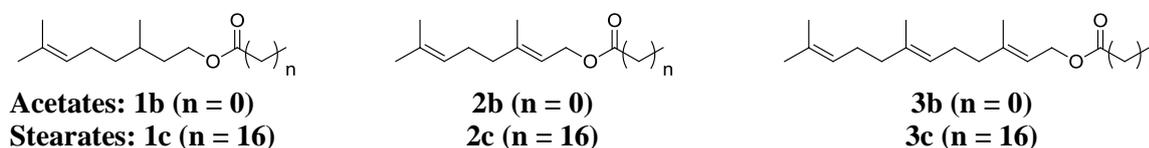
A.1- Criteria for selecting the models

Twelve terpenoids with one, two or three double bonds are studied. Among them three polyisoprenes are prepared according to known methods, i.e. the 2,6-dimethyl-2-octene **1a**, the 2,6-dimethyl-2,6-octadiene **2a** and the 2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodecatriene **3a**. They present less interest in perfumery

than the corresponding alcohols and esters but they allow us to study the formation and the decomposition of hydroperoxides by overcoming the effect of other functions



The three acetates of citronellol **1b**, geraniol **2b** and farnesol **3b** are examined as they are important raw materials in perfumery. The corresponding stearates **1c**, **2c** and **3c** are also investigated, although they have no practical interest. Actually their high molecular weight allows the detection of the molecular peaks of the hydroperoxides **1Hc**, **2Hc** and **3Hc** by MS after cationisation with Li^+ . Furthermore, the analysis of volatiles emitted during the thermolysis of these hydroperoxides is simplified because the molecular fragments linked to the stearate function are too heavy to be volatilized in the gas phase.



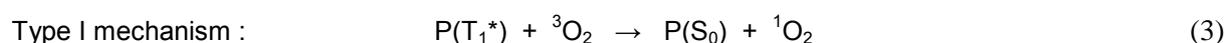
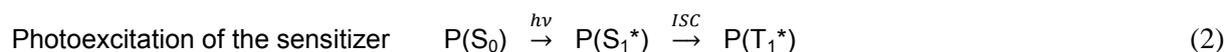
A.2- Singlet oxygenation of terpenoids

Most terpenoids contain electron-rich double bonds capable of reacting with ground state oxygen via a radical chain reaction producing, in the first step, several hydroperoxides. As ground state oxygen is in a triplet state ($^3\text{O}_2$), its reactions with ground state organic compounds (singlet state) are generally slow at room temperature, but they can be accelerated by heat, UV light, radical initiators or transition metal such as Co^{2+} or Cu^{2+} .¹⁷⁻²¹ However under these harsh conditions, hydroperoxides themselves are unstable and partially decompose to give secondary oxidation products. As we want to isolate the terpenic hydroperoxides in order to study their subsequent thermolysis, we turned to singlet oxygenation. In contrast to ground state oxygen ($^3\text{O}_2, ^3\Sigma_g^-$), excited singlet oxygen ($^1\text{O}_2, ^1\Delta_g$) has found considerable synthetic utility because it can undergo selective reactions with a wide variety of electron-rich substrates. In particular, it readily reacts with electron-rich olefins containing an allylic hydrogen according to a non-radical process called ene-reaction (Schenk Reaction). Oxygen inserts into one of the allylic C-H bonds with concomitant migration of the double bond. The reaction of singlet oxygen with polyisoprenic substrates does not exhibit appreciable regioselectivity and 1:1 mixtures of secondary and tertiary allylic hydroperoxides are formed (Eq. 1).

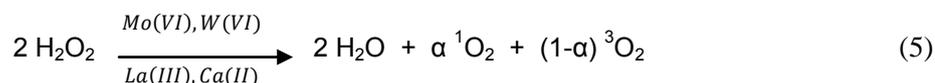


Singlet oxygen is currently generated via indirect photochemical excitation of $^3\text{O}_2$ in the presence of specific dyes which can act as photosensitizers.²² This method is very versatile since it can be

conducted in a wide range of solvents and at low temperature if necessary. In the photochemical process, the photosensitizer P absorbs visible light giving the singlet excited state S_1^* which is converted into the triplet excited state T_1^* after intersystem crossing (ISC) (Eq. 2). As the lifetime of the T_1^* state is much longer (μs - ms) than that of the S_1^* state (ps - ns), it can react with $^3\text{O}_2$ to convert it into $^1\text{O}_2$ via a spin-allowed energy transfer (Eq. 3) This process, defined as type I mechanism, competes with type II mechanism involving a hydrogen-atom abstraction or electron-transfer between T_1^* and oxygen or the organic substrate, yielding various free radicals such as the superoxide radical anion $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Eq. 4).



Singlet oxygen can also be chemically generated by many different processes such as (i) the oxidation of hydrogen peroxide by hypochlorite anion,²³ (ii) the thermolysis of phosphate ozonides²⁴ or (iii) the incubation of aromatic endoperoxides.²⁵ However the most convenient methods used to produce large amounts of $^1\text{O}_2$ are based on the disproportionation of hydrogen peroxide catalyzed by a number of inorganic catalysts¹³ among which, Na_2MoO_4 ,²⁶ Na_2WO_4 ,²⁷ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ²⁸ et $\text{La}(\text{OH})_3$ ²⁹ are the most efficient (Eq. 5). In particular, it is well established that this reaction provide $^1\text{O}_2$ with a 70% yield ($\alpha = 0.7$) when the reaction is conducted in methanol with sodium molybdate as catalyst.¹⁴



Both sources of $^1\text{O}_2$ ($\text{O}_2/h\nu/\text{sensitizer}$ and $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$) are used to peroxidize the terpenoids models **1-3** since each method has its own advantages and drawbacks. The photooxidation may be carried out in deuterated solvents allowing direct NMR analysis but side products may be formed through type I mechanism, whereas chemical oxidation does not require photochemical reactors and can be easily conducted on gram scale but side reactions may occur via an interaction of fragile substrates with H_2O_2 or intermediate peroxomolybdates.³⁰

The photochemical singlet oxygenations were carried out at 5°C by irradiation with a sodium lamp of a solution of the substrate (0.03 M) in CH_2Cl_2 with tetraphenylporphyrin (10^{-4} M) as sensitizer and slow bubbling of O_2 . Alternatively, the dark singlet oxygenations were performed at 20°C by adding batches of H_2O_2 to a stirred solution of the substrate (0.03M) and Na_2MoO_4 (0.05M) in MeOH. In both cases, the reaction was monitored by HPLC, TLC or by GC-FID after previous reduction of hydroperoxides with triphenylphosphine. Terpene hydroperoxides isolated from the reaction media were analyzed by ^1H and ^{13}C NMR and no difference was observed between the samples prepared by chemical or photochemical routes.

The rate of disappearance of citronellyl acetate **1b** and its parent compound **1a** are similar as well as the proportion of tertiary (55%) and secondary (45%) hydroperoxides. On the other hand, as shown on figure 2, geranyl acetate **2b** behaves differently from the parent diene **2a**, because the acetate function decreases the electronic density of the 2,3-double bond and, therefore, its reactivity toward $^1\text{O}_2$.

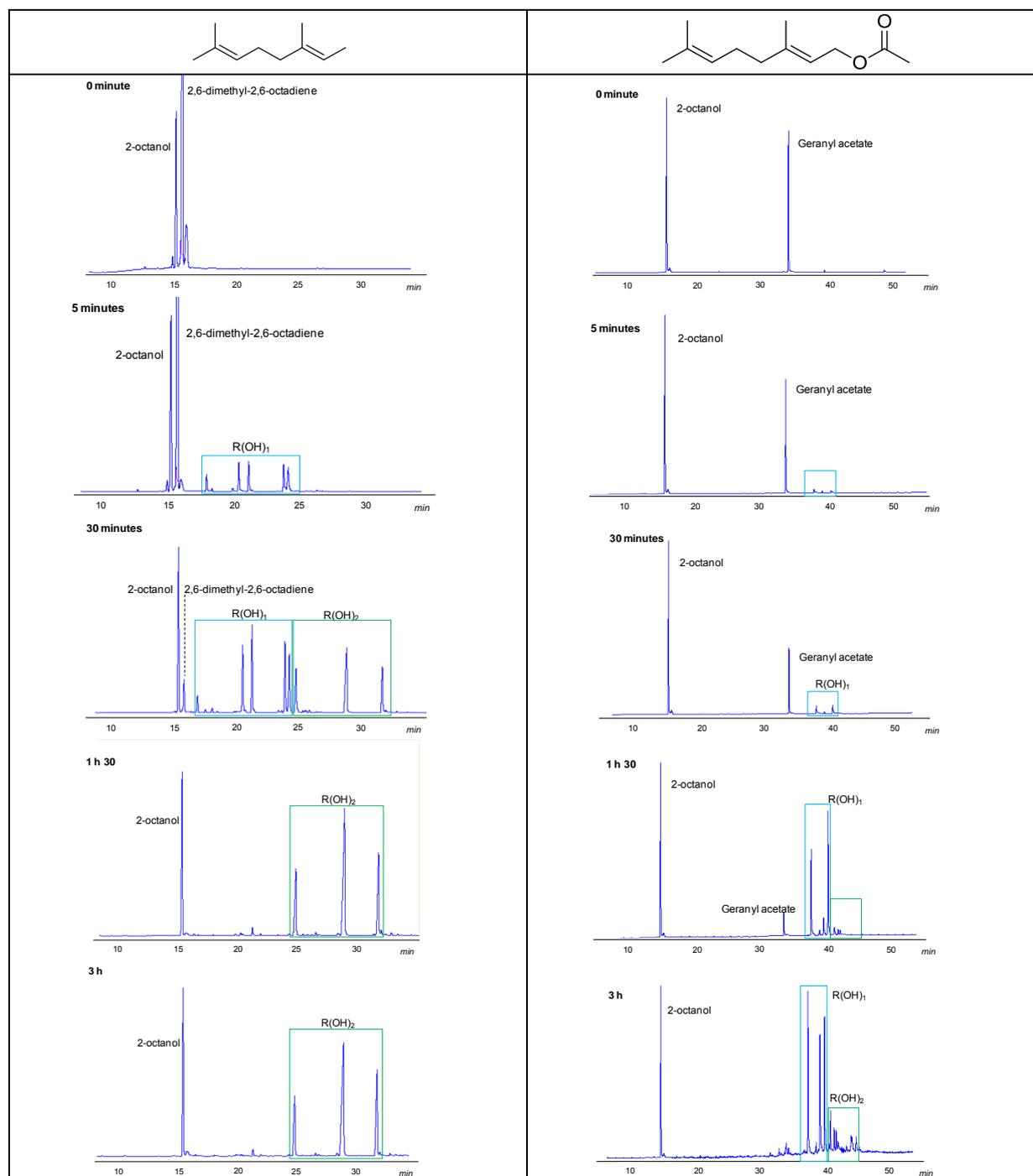


Figure 2. Evolution through photooxidation time of the GC-FID chromatograms of 2,6-dimethyl-2,6-octadiene **2a** and geranyl acetate **2b** hydroperoxides previously reduced into alcohols. 2-octanol is added as an internal standard.

Both dienes, 2,6-dimethyl-2,6-octadiene **2a** and geranyl acetate **2b** exhibit two double bonds which may lead to 9 mono-hydroperoxides and 18 di-hydroperoxides (Table 1) shown in figure 3.³¹

Table 1: Number of differentiable isomeric (poly)hydroperoxides using a non-chiral analytical method.

Number of -OOH	Citronellol derivatives 1	Geraniol derivatives 2	Farnesol derivatives 3
mono	2	9	15
di	-	18	72
tri	-	-	108

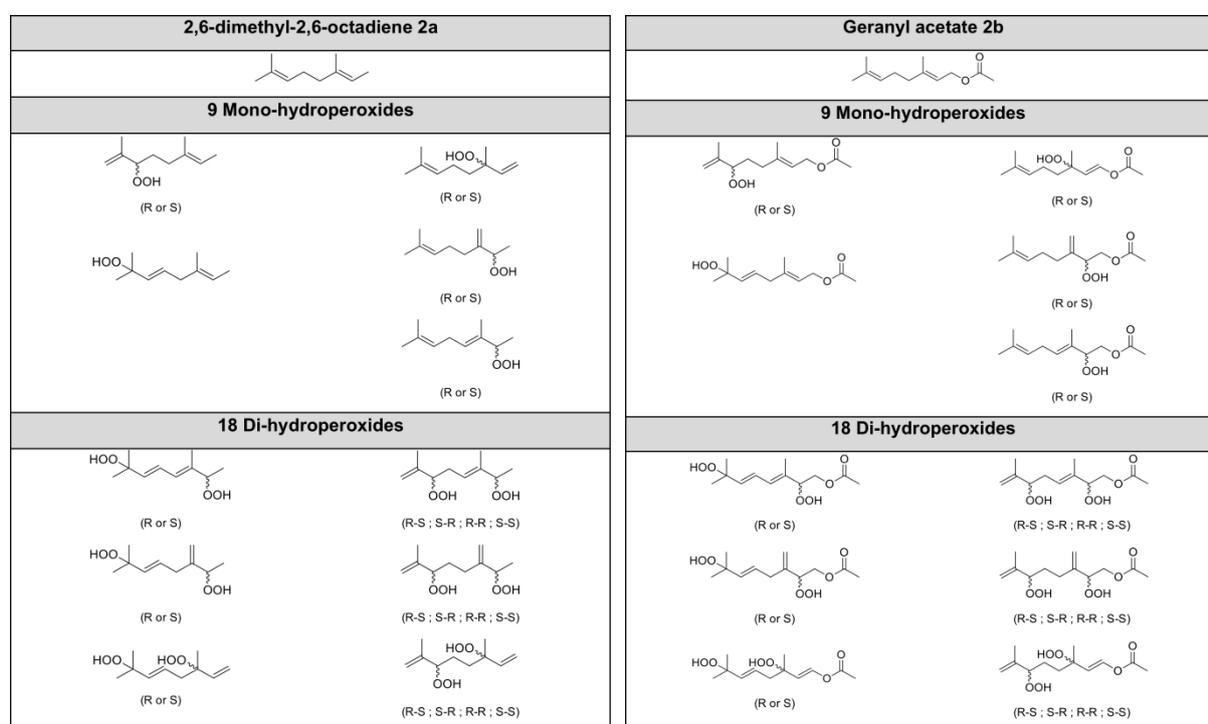


Figure 3. Molecular structure of all mono- and di-hydroperoxides that may be obtained by singlet oxygenation of 2,6-dimethyl-2,6-octadiene **2a** and geranyl acetate **2b**.

The two double bonds still present in the 9 di-hydroperoxides are less electron-rich and do not further react with $^1\text{O}_2$ under our experimental conditions. The reactivities of the two double bonds of **2a** are almost similar and the di-hydroperoxides appear together with the mono-hydroperoxides (Figure 4A). But, for the geranyl acetate **2b**, the 2,3 double bond with an allylic acetate is substantially less reactive than the 6,7 double bond substituted with 3 alkyl groups. As a result, mono- and di hydroperoxides are generated successively³² and the formation of di-hydroperoxides only begins when the first double bond has completely reacted with $^1\text{O}_2$ as shown in Figure 4B.

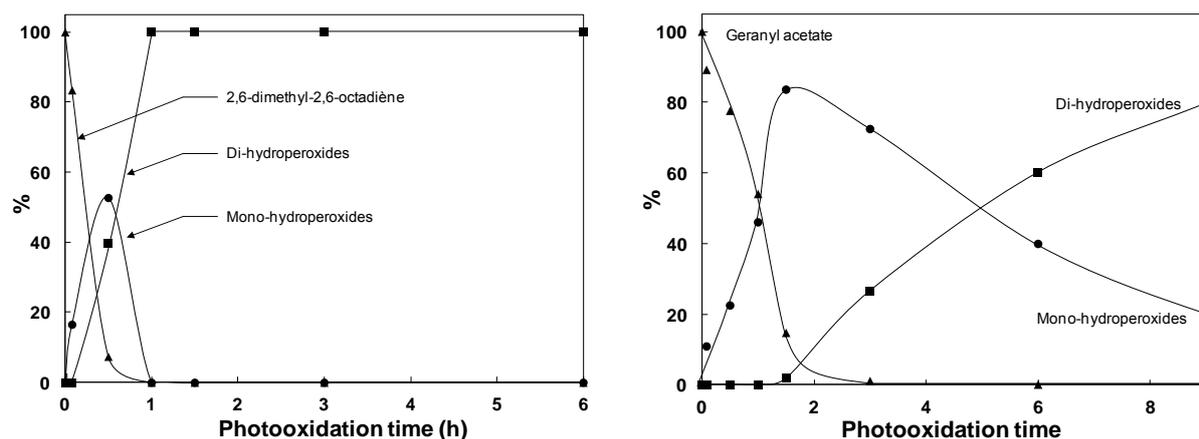


Figure 4. GC-FID monitoring of the photooxygenation of 2,6-dimethyl-2,6-octadiene **2a** (left) and geranyl acetate **2b**. Conditions : substrate 0.03M, tetraphenylporphyrin 10^{-4} M in CH_2Cl_2 , with slow bubbling of O_2 , irradiation with a sodium lamp 150W, temperature 5°C . Hydroperoxides were reduced with 5 equivalents of triphenylphosphine prior analysis.

A.3- Analysis of hydroperoxides by ^1H and ^{13}C NMR and nanoESI-Qq-TOF MS

^1H and ^{13}C NMR analysis were performed on the complex mixture containing all the mono- di- and tri-hydroperoxides obtained after 6 hours of photooxidation. The two regio-isomeric mono-hydroperoxides obtained from citronellol derivatives **1a-c** could be easily distinguished and quantified (Table 3). On the other hand, as 9 mono- 18 di- hydroperoxides can be obtained from the dienes **2a-c**, the determination of the proportion of each product was not possible. Nevertheless, we were able to determine the relative percentages of the three main structural units A, B, C and D shown in Table 2 (Table 3). Finally, 15 mono-, 72 di- and more than 100 tri- different hydroperoxides (Table 1) can theoretically be obtained from farnesol derivatives **3a-c** and their NMR spectra are too complicated to be addressed.

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR characteristics of main hydroperoxide patterns in CDCl_3 . A: end chain tertiary hydroperoxide, B: end chain secondary hydroperoxide, C: internal tertiary hydroperoxide, D: internal secondary hydroperoxide

Patterns	^1H (300 MHz)	^{13}C (75 MHz)
<p>A</p>	$\delta = 5,68-5,52$ (2H, d, H_3 and H_4); $1,33$ (6H, bs, H_{1-6})	$\delta = 135,5$ (CH, C_3); $126,7$ (CH, C_4); 82 (C, C_2)
<p>B</p>	$\delta = 5,21-5,06$ (2H, m, H_1); $4,43-4,25$ (1H, m, H_3); $1,62$ (2H, bs, H_4); $1,59$ (3H, bs, H_6)	$\delta = 143$ (C, C_2); 122 (CH_2 , C_1); $89,3$ (CH, C_3)

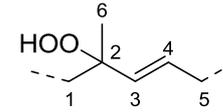
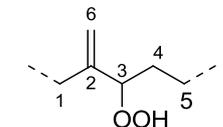
C 	5.13 (1H, d, H_3 or H_4) 1,33 (3H, bs, H_{1-6})	$\delta = 137.0$ (CH, C_3); 129.5 (CH, C_4); 84.2 (C, C_2)
D 	$\delta = 5,04-4,98$ (2H, m, H_6); $4,43-4,25$ (1H, m, H_3); $1,62$ (2H, bs, H_4)	$\delta = 147$ (C, C_2), 113 (CH_2 , C_6); $84,3$ (CH, C_3)

Table 3. Proportions (%) of the three types of hydroperoxide patterns **A**, **B**, **C** and **D** found in the molecular structures of the different terpenic substrates **1-3** after maximum peroxidation with 1O_2 . For **2a**, hydroperoxides located at the end or in the middle of the chain are indistinguishable and only the cumulative percentages of secondary ($X_B + X_D = 49\%$) and tertiary ($X_A + X_C = 51\%$) hydroperoxides could be determined.

Starting terpenoid	1a	1b	1c	2a	2b	2c
A: Tertiary end-chain	57	55	50	X_A	35	30
B: Secondary end-chain	43	45	50	X_B	34	26
C: Tertiary internal	-	-	-	X_C	16	16
D: Secondary internal	-	-	-	X_D	13	28

Analyses of hydroperoxides by nano ESI-Qq-TOF MS: The solutions of terpenoids hydroperoxides were also analyzed as such (without reduction) by mass spectrometry to verify the presence of the expected mono-, di- or tri- hydroperoxides and the absence of compounds with a greater number of OOH groups as well as degradation products such as alcohols, aldehydes, epoxides, etc... To avoid decomposition of hydroperoxides during ESI/MS analysis, we used very gentle conditions by injecting with a nano-electrospray source a acetonitrile solution of hydroperoxides previously cationized with lithium chloride.³³ As shown by C. Tokarski for the analysis of traces of archaeological triglycerides, the cationization by lithium ion induces a powerful enhancement of the sensitivity and selectivity of the analysis.¹⁵ This analytical procedure is very mild and exhibits a good sensitivity towards hydroperoxides. However, the molecular weights of hydroperoxides obtained from olefins **1a-3a** and acetates **1b-3b**, are too low and it has proved very difficult to obtain unambiguous results because molecular peaks are in the same zone than sample impurities. So we studied the hydroperoxides of the 3 terpenoids stearates **1c**, **2c** and **3c** with molecular weights greater than 400 g.mol^{-1} . The corresponding MS profiles are presented on figure 4 and the assignment of the peaks are reported in table 4.

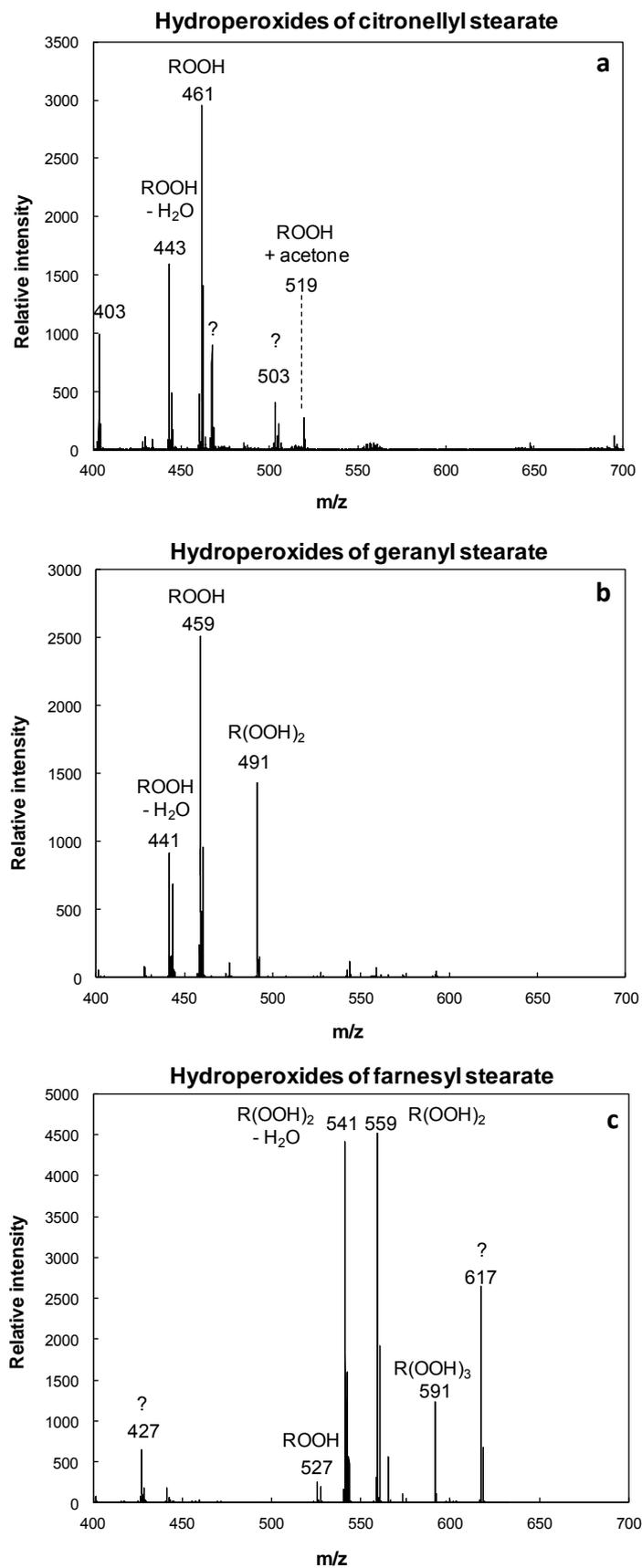


Figure 4. ESI-MS spectra of stearate hydroperoxides of (a) Citronellyl **1c**, (b) Geranyl **2c** and (c) Farnesyl **3c**.

ESI-MS spectra confirms that citronellyl stearate **1c** gives solely mono-hydroperoxides as attested by the main peak $[M + Li]^+$ at m/z 461 beside secondary peaks assigned to $[M + Li + CH_3C(O)CH_3]^+$ at m/z 519 and $[M + Li - H_2O]^+$ at m/z 443. The hydroperoxides of geranyl stearate **2c** lead to two main peaks corresponding to the mono-hydroperoxides $[R(OOH)_1 + Li]^+$ at m/z 459 and the di-hydroperoxides $[R(OOH)_2 + Li]^+$ at m/z 491 beside the less abundant ion $[M + Li - H_2O]^+$ at m/z 441. This spectrum reveals that di-hydroperoxides are present in smaller quantities than mono-hydroperoxides in agreement with previous GC-FID analyses. ESI-MS analysis of the mixture of farnesyl stearate **3b** hydroperoxides provides three degrees of peroxidation. The third spectrum of figure 4 shows several peaks in increasing order of abundance as follow: m/z 527 $[R(OOH) + Li]^+$, m/z 427 $[(R(OOH) + Li) - (H_2O)]^+$, m/z 591 $[R(OOH)_3 + Li]^+$, m/z 541 $[(R(OOH)_2 + Li) - (H_2O)]^+$ and m/z 559 $[R(OOH)_2 + Li]^+$.

Table 4. Assignment of peaks appearing in the ESI-MS spectra of hydroperoxides of Citronellyl **1c**, (b) Geranyl **2c** and (c) Farnesyl **3c** stearates.

Stearate	ROOH - H ₂ O	ROOH	R(OOH) ₂ - H ₂ O	R(OOH) ₂	R(OOH) ₃	Other peaks
Citronellyl 1c	443	461	-	-	-	503, 519
Geranyl 2c	441	459	-	491	-	-
Farnesyl 3c	-	527	541	559	591	617

The low stability of hydroperoxides is visible in these spectra because many peaks correspond to the loss of water and the formation of an epoxide..

B - Volatiles released by thermolysis of terpenoids hydroperoxides

Two complementary techniques were used to study volatile compounds formed during the thermolysis of hydroperoxides prepared by singlet oxygenation of citronellol **1a-c**, geraniol **2a-c** and farnesol **3a-c** derivatives. The first one is cumulative since all volatiles formed during a certain period of time are trapped in cold CDCl₃ and studied by ¹H and ¹³C NMR spectroscopies. The second one allows a kinetic analysis in real time since volatiles are detected by MS-FTICR as and when they are formed during thermolysis. However, this technique cannot provide structural information since it only gives the molar mass of the detected volatile compounds.

B.1- Yields of volatile formed by thermolysis of terpenoid hydroperoxides

A priori, the heating of hydroperoxides may lead to different types of phenomena. Either the hydroperoxide is sufficiently volatile to allow that a part of it volatilizes without chemical

modification or the RO-OH bond is cleaved, giving two radicals that initiate free radical chain reactions. They include intra- or inter-molecular reactions leading to the emission of volatile molecular fragments or to the formation of non-volatile compounds of high molecular weight. In order to determine the maximum yield of volatile, the weight losses of hydroperoxides at 80°C were monitored during one week. For that, samples of substrat completely peroxidated have been deposited in a glass cell and this cell is weighed at different moments during one week. The weight losses measured after 4 h and one week are reported in table 5 and shown on Figure 5. We note that, for the citronellol derivatives **1a-b**, which have only one double bond, there is virtually no polymerization since the thermal decomposition gives about 95% of volatile compounds. However for the hydroperoxide of **1c**, the stearic moiety which accounts for 62% of the molecule is not at all volatile but 25% is nevertheless emitted in the gas phase suggesting heavily that some C-C or C-O cleavage occurs. For geranyl and farnesyl derivatives **2a-c** and **3a-c**, polymerization increases but there is always at least one third of the weight of the starting compound that passes in the gaseous phase.

Table 5. Weight loss for each hydroperoxide after 4 h and 1 week of thermolysis at 80°C

Hydroperoxides of	Number of double bonds	Weight loss after 4 h (%)	Weight loss after 1 week (%)
2,6-dimethyl-2-octene 1a	1	80	94
Citronellyl acetate 1b	1	22	95
Citronellyl stearate 1c	1	18	25
2,6-dimethyl-2,6-octadiene 2a	2	52	74
Geranyle acetate 2b	2	22	68
Geranyl stearate 2c	2	34	45
2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodecatriene 3a	3	26	42
Farnesyl acetate 3b	3	12	35
Farnesyl stearate 3c	3	24	36

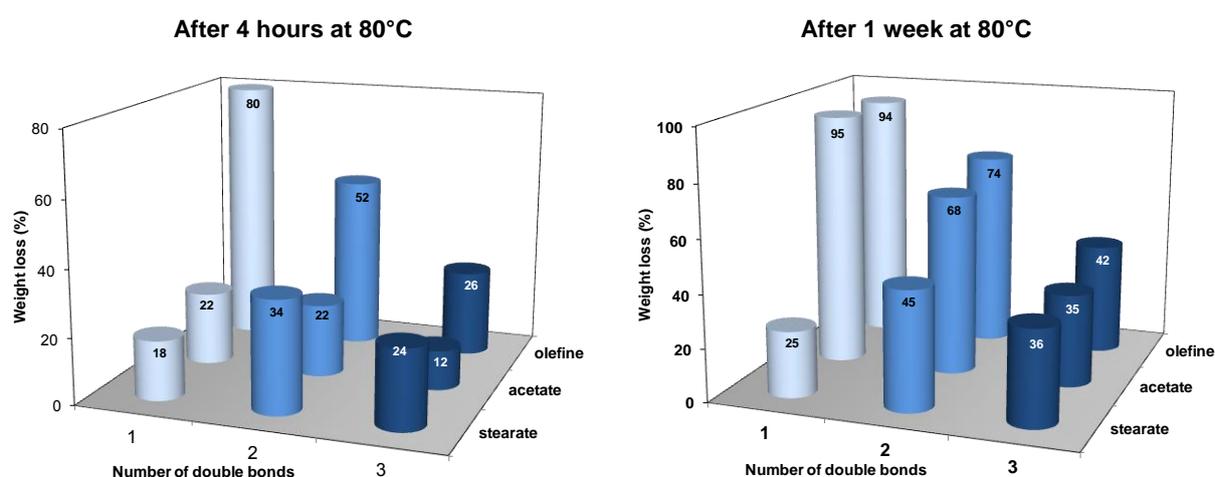


Figure 5. Weight losses after 4 h and 1 week at 80°C of citronellyl **1a-c** (1 double bond), geranyl **2a-c** (2 double bonds) and farnesyl **3a-c** (3 double bonds) hydroperoxydes according to the number of double bonds of the model.

B.2- Cold trapping of volatile organic compounds

For determining the molecular structure of the main volatiles, isolated hydroperoxides of each squalene sub-structure were heated at 80 ° C for 4 hours under an argon flow and the compounds emitted in the gaseous phase were condensed in CDCl₃ cooled to -8 ° C. Two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy (homonuclear ¹H/¹H COSY) has been used to identify spins which are coupled to each other. COSY spectra show two types of peaks: diagonal peaks have the same frequency coordinate on each axis and appear along the diagonal of the plot, while cross peaks have different values for each frequency coordinate and appear off the diagonal. Diagonal peaks correspond to the peaks in a 1D-NMR experiment, while the cross peaks indicate couplings between pairs of nuclei. By resorting to these techniques we were able to identify a number of molecules present in the CDCl₃ solution without needing prior separation. In agreement with previous studies on the oxidative thermolysis of triglycerides,³⁵ the NMR spectra reveal the formation of various aldehydes (methacrolein, acetaldehyde, 3-methyl-2-butenal), ketones (acetone), alcohols (ethanol) but also epoxides that are rarely detected. The addition of an internal standard was used to quantify the different compounds by integrating the corresponding peaks. The list of compounds detected by NMR and their relative amounts are reported either in italics or bold in Table 6 and the molecular structure of the main volatiles are shown on figure 6.

Tables 6. Quantification (ppm/mg of degraded hydroperoxide) of volatile compounds emitted during thermolysis of hydroperoxides and detected by trapping in CDCl₃. The quantification is allowed by an internal standard, the naphthalene, at 10⁻³ mol.L⁻¹.

Volatile	MW	1a	1b	1c	2a	2b	2c	3a	3b	3c
Methanol	32	3	1	12	4		13	0.6	4	
Acetaldehyde	44				29			61	28	14
Ethanol	46		31		142	8	19	58	7	5
Acrolein	56							17		18
Acetone	58	962	444	253	557	214	111	281	1498	117
Acetic acid	60		45						325	95
Methyl formate	60					68				84
Methacrolein	70	141	26	10	206		13		38	
Methyl vinyl ketone	70							98		664
2, 2-dimethyloxirane	72					12				
3-methyl-2-butenal	84		86			10		10		
2-methylbut-3-en-2-ol	86		83	41		28				
Ethyl acetate	88	95			42	16				
Dimethyl vinyl oxirane	98	22								

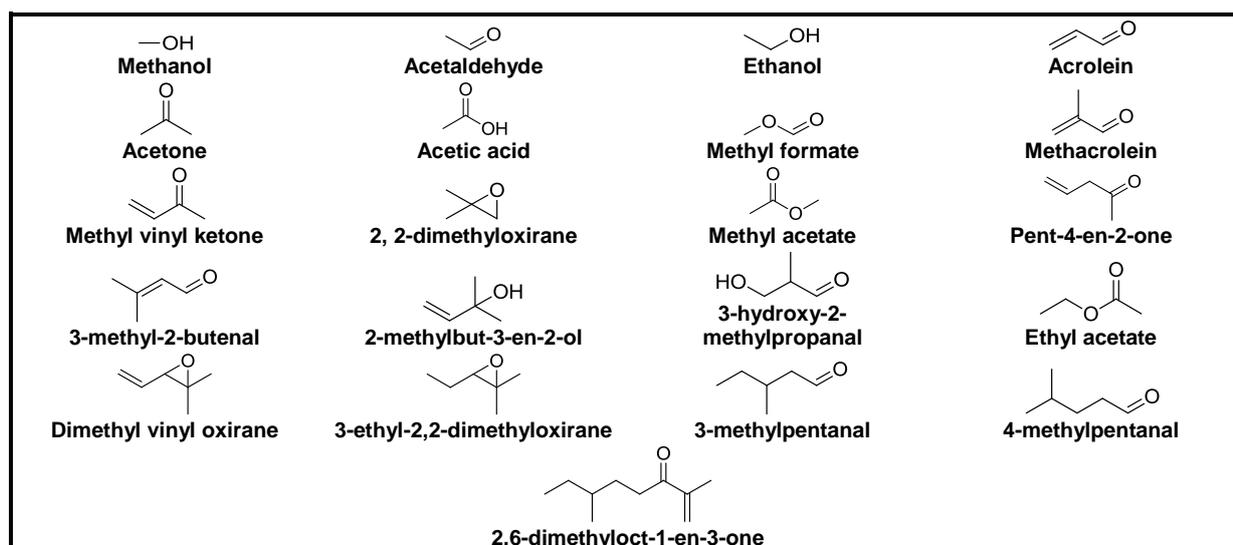


Figure 6: Identification of volatile compounds from thermolysis of hydroperoxides for all the studied substrats.

B.3- Analysis of volatiles in real time using MS-FTICR

A particularly suitable analytical tool for complex mixtures of volatile organic compounds (VOCs) is proton transfer reaction associated with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (PTR-FTICR). This technique is based on chemical ionization of the organic compounds by proton transfer reaction from H_3O^+ , and detection of the resulting ions with an FTICR mass analyser. Each organic compound R of molecular mass M is thus detected as the corresponding protonated ion RH^+ , at $m/z = M + 1$. Two gas inlet lines are used to introduce gas into the mass spectrometer. The first one is used for introduction of water necessary to generate the H_3O^+ precursor ions. The second one allows introduction of the sample. The H_3O^+ ions are produced in the cell by electron ionization of H_2O at a typical pressure of 10^{-5} Torr using a 70 eV electron beam, followed by ion-molecule reaction of the resulting H_2O^+ ions (Eq. 6). Then, H_3O^+ transfer a proton to the compounds to be analysed (Eq. 7).



The choice of the precursor (H_3O^+) must be adapted to allow a soft ionization to limit the fragmentation of molecules studied and a gain of selectivity. Indeed, the proton transfer takes place, only if the molecule M proton affinity is greater than that of the precursor. By plotting a selection of relevant molecules (solvents, typical volatiles, compounds bearing common functions) as a function of their proton affinity, we obtain the figure 7 showing the type of compounds that can be detected by this method. As the precursor ion is H_3O^+ (m/z 19.03), all the compounds located above the protonic

affinity value of H_2O can be detected. Therefore, H_3O^+ allows the ionization of most of possible volatile organic compounds, without reacting with the major constituents of air. It is worth to note that the alkanes and chlorinated compounds are not detected by this technique. This selectivity is an advantage here since it avoids the possible saturation of MS spectrometer by residual chlorinated residual solvents such as CH_2Cl_2 that is used for the photochemical preparation of hydroperoxides .

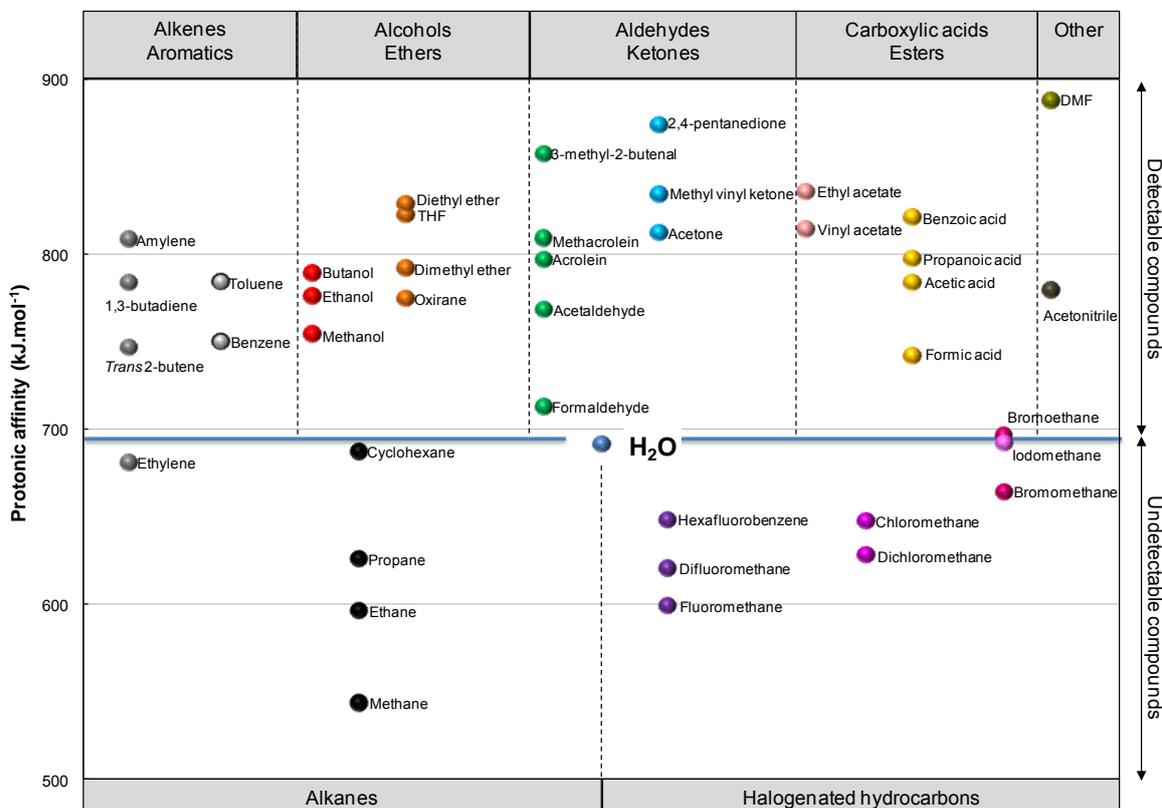
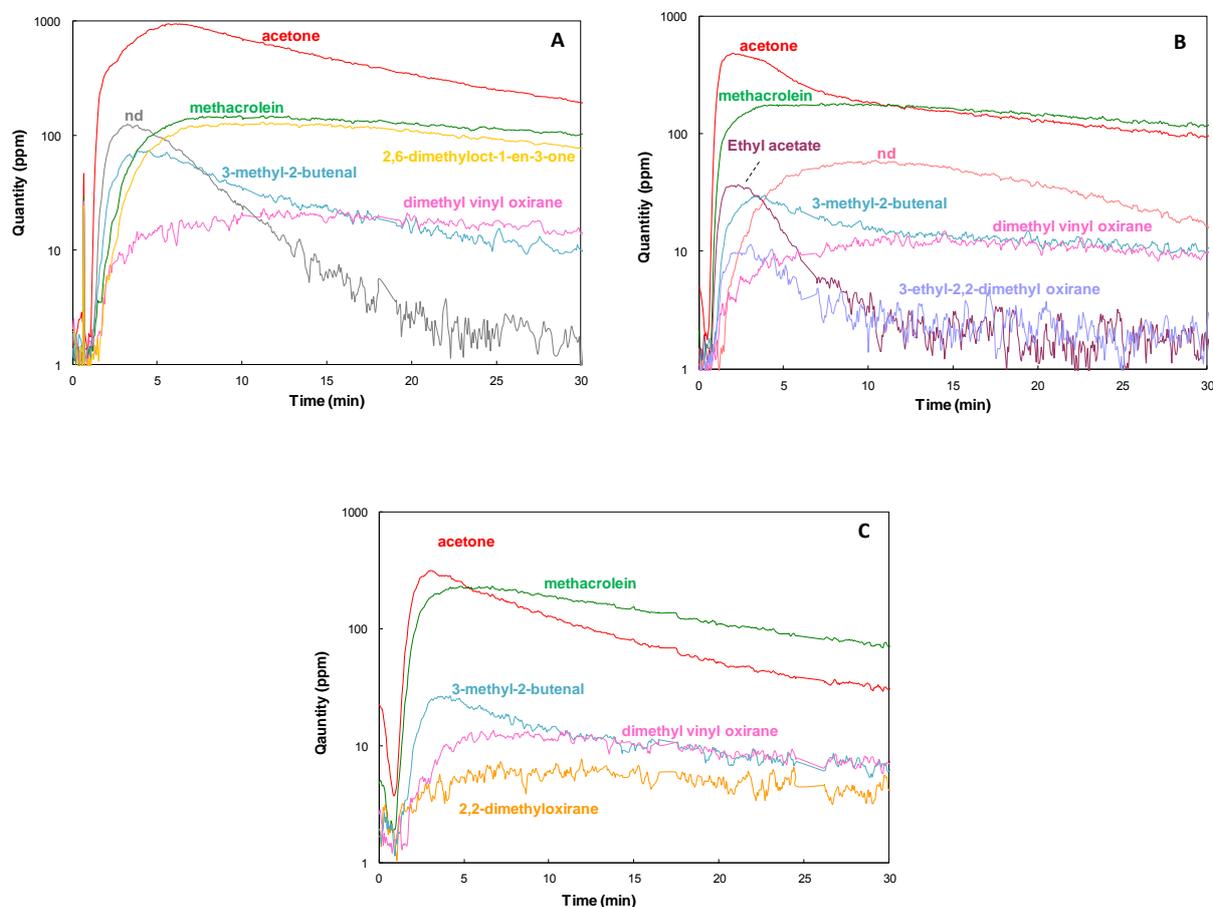


Figure 7: Proton affinity of typical organic compounds of interest compared to the proton affinity of water.

Hydroperoxides of **1a**, **1b**, **1c**, **2a**, **2b**, **2c**, **3a**, **3b**, **3c** were heated under the same conditions (100 °C, 30 minutes, N₂). Two major compounds were detected: acetone and methacrolein. The presence of isomers can not be excluded because the method gives only the molar mass of the protonated ions. In addition to these main products, epoxides (dimethyl vinyl oxirane, 3-ethyl-2,2-dimethyl oxirane, 2,2-dimethyloxirane) and 3-methyl-2-butenal have been identified while many other compounds minors have also been detected, but in much smaller proportions. The concentration of major compounds had been recorded during the time of thermal degradation (Supporting Information S8). The emission profiles versus time of the volatile coming from the thermal decomposition of **1a**, **2a** and **3a** are shown in Figure 8.

Figure 8: Time profile of the main volatile organic compounds from the thermal degradation of **A)** 2,6-dimethyl-2-octene hydroperoxides, **B)** 2,6-dimethyl-2,6-octadiène, **C)** 2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodecatriene, under nitrogen at 100°C. The initial sample mass is 100 mg.



The profiles shown by figure 8 correspond to the terpenoids hydroperoxides prepared from **1a**, **2a** and **3a**. The emission of gaseous products begins once sample is introduced into the oven (within less than 1 minute). The volatiles presented a strong emission for 10 to 15 minutes. For larger samples acetone concentration tends to increase progressively up to a maximum before decreasing. For the other volatiles they increase slower and their concentration remains almost constant. For the three samples, acetone is the first and the main emitted product. Its quantity decreases with the number of double bonds while the amount of methacrolein increases. For larger samples, either methacrolein or 3-methyl-2-butenal are the second most important product followed by the dimethyl vinyl oxirane. The greatest diversity of VOCs is observed with 2,6-dimethyl-2-octene hydroperoxides because of the lightness of the two fragments resulting from their cleavage. The comparison between the three terpenoids has shown that more the double bonds, the less VOCs are emitted. This trend can be explained by an increase of the polymerization pathway with the number of double bonds. The formation of the 2,2-dimethyloxirane and the dimethyl vinyl oxirane revealed the cyclization of alkoxy radicals. The profiles obtained with the other one samples exhibit the same general pattern.

However, with the presence of polar function different volatile can be identified from the cleavage of the hydroperoxide nearest of the ester. The formation of methyl acetate and methyl formate is characteristic of ester group.

For the nine tested samples, the emission composition does not show any significant trend. It is summarized as follows (relative average amount in percent for the emission stages): (acetone) 11.1-76%, (methacrolein) 1.7-18.5%, (3-methyl-2-butenal) 1-12.3%, (dimethyl vinyl oxirane) 0-4.3%, (2,2-dimethyl oxirane) 0-2.7%. The relative amounts of the other volatiles are less than 8% and more typical of some of samples.

Table 6 presents comparative data from B-trap spectrometer and NMR analysis. Whatever the initial hydroperoxide, acetone is always the major and the first product releases during thermolysis. The emission of acetone is followed by the emission of an unidentified product having a molecular weight equal to 84. Several products can match this mass: methyl vinyl ketone, 3-methyl-2-butenal, 2-methylbut-3-en-2-ol or 2-methyl-2-ene. Hydroperoxides stearates are the compounds that emit the least VOCs contrary to olefins derivative, especially 2,6-dimethyl-2-octene hydroperoxides. The third major product detected is methacrolein. In the case of 2,6-dimethyl-2,6-octadiene, farnesyl acetate and 2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodecatriene, the methacrolein is output in second.

Other compounds have also been formed in a minor amount. Indeed, α and β scission cannot explain the formation of all the VOCs obtained, other reactions occurred during the degradation of hydroperoxides at 80 °C. Due to the formation of a radical intermediate, recombination reactions or cyclization may take place. This can explain the other by-products detected by B-trap spectrometry.

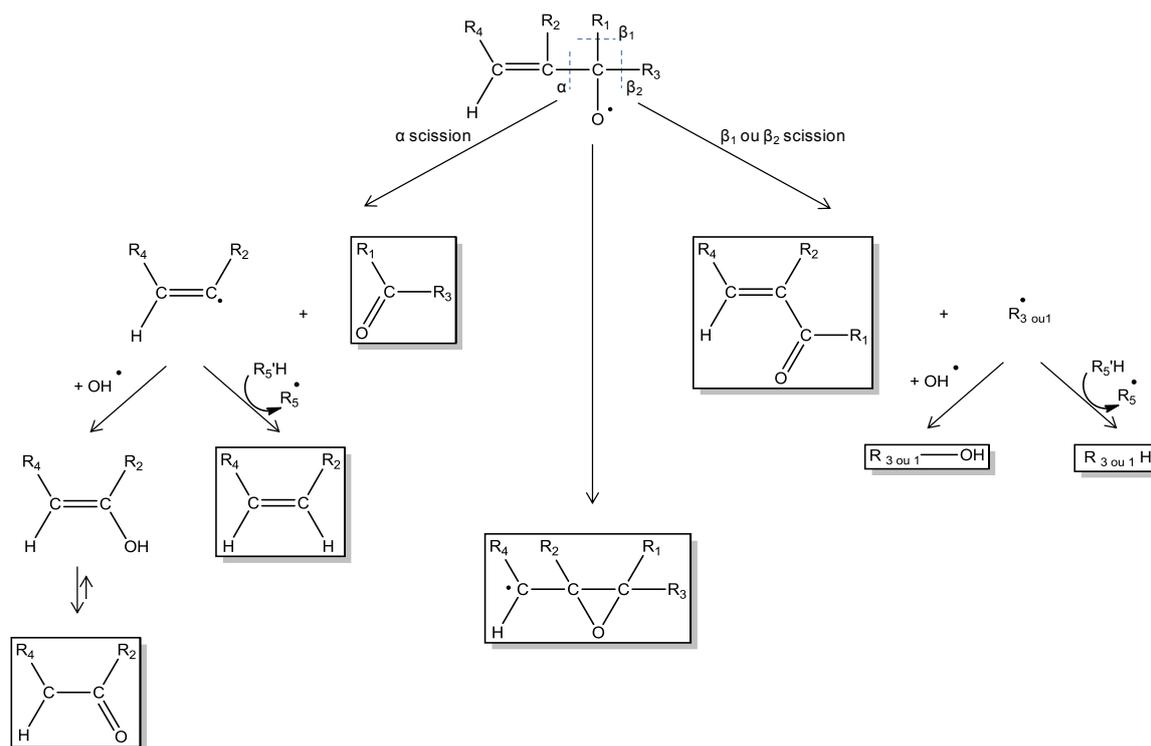
Hydroperoxides are known for their allergenic properties.³⁶ The results presented here show that their decomposition leads to the emission of harmful VOCs such as acrolein⁸ or the epoxides³⁷ whose toxicity, mutagenicity and carcinogenicity are well established. Thus, it was published that epoxides such as 2,2-diméthylloxirane can undergo a ring-opening reaction in vivo with natural nucleophilic compounds such as proteins or DNA and trigger a carcinogenic effect.

C- Mechanisms involved in hydroperoxide thermolysis

Schaich wrote a review in 2005 on lipid oxidation that describe in detail the main pathways of hydroperoxides decomposition.⁹ The first step is the cleavage of the RO-OH bond to give OH• and an alkoxy radical RO• which initiates a chain radical involving ROO• as another radical intermediate. Nevertheless, RO• reacts faster than ROO• so becomes dominant almost as soon as ROOH breaks

down. Competing reactions by $\text{RO}\cdot$ include: atom or group transfer (H abstraction), rearrangement / cyclization, addition to double bonds (crosslinks), disproportionation, α and β -scission, recombination and electron transfer. The dominating mechanism in a given system is determined largely by the structure of the double bonds, solvent conditions and steric factor.

From NMR and B-trap spectrometry results, a general mechanism can be written³⁸⁻⁴⁰ involving mainly α and β scission and cyclization [1,3] or [1,2] from $\text{RO}\cdot$.



Scheme 1: General mechanism showing the possible evolution of alkoxy radical $\text{RO}\cdot$

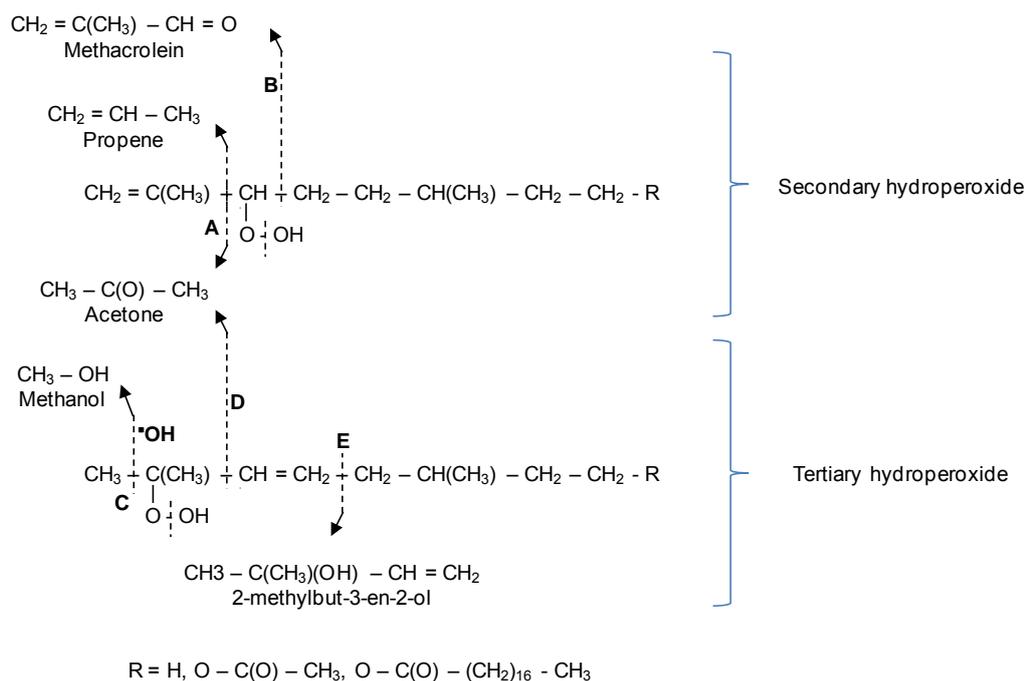
Fragmentation scheme **1** explains the formation of most of the volatiles produced by thermal decomposition of mono-hydroperoxides. This general scheme has been applied on one tertiary hydroperoxide and one secondary hydroperoxide as example. That is detailed in scheme 2. By this way, we illustrate the formation of the main VOCs from thermolysis of typical performed hydroperoxide.

For secondary hydroperoxides, internal cleavage A producing acetone and internal cleavage B leading to methacrolein are the most important according to final detected products. Internal cleavage A should produce propene too but it is a minor volatile. In the tertiary hydroperoxide on scheme 2, cleavage D forms acetone too that can account for the important quantity produced. Cleavage C may explain the formation of methanol involving the addition of an $\cdot\text{OH}$ radical. Cleavage E may explain the formation of 2-methylbut-3-en-2-ol by the addition of an $\cdot\text{H}$ radical. In the case of 2,6-dimethyl-2-octene, NMR reveals that the production of acetone is associated with the propene formation

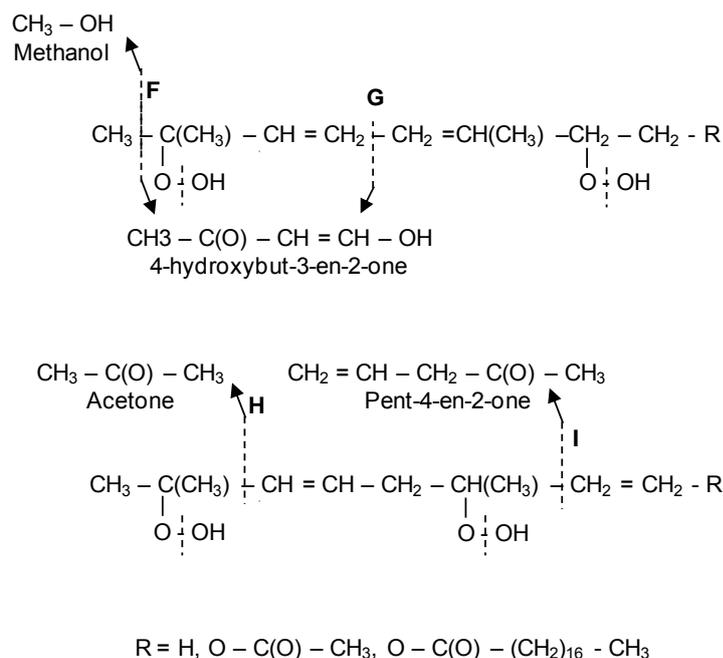
(scheme1). The formation of dimethyl vinyl oxirane was monitored by NMR and mass spectrometry. The production of oxirane may be postulated via first step of epoxyde formation.

In scheme 3, fragmentation corresponds to substrates with at least 2 hydroperoxides. The scissions of hydroperoxides on the first insaturation are the same than in the scheme 2. The formation of methanol can be explained by the external cleavage F. The formation of acetone by cleavage H is equivalent to the fragmentations A and D. 4-hydroxybut-3-en-2-one from di-hydroperoxide can be explained by two simultaneous cleavages F and G and the addition of $\cdot\text{OH}$ radical. After the cleavage H, a scission between the second hydroperoxide group and double bond may explain the formation of the pent-4-en-2-one.

Thermal fragmentation of hydroperoxides shows dominant cleavages A, D and H in position α relative to the unsaturation between the hydroperoxide group and the allylic double bond.^{41,42} The number of secondary products reveals the complexity of thermal degradation of hydroperoxides. The difficulties of mechanisms, including alcohol, ketone and aldehyde formation is due to the cleavage on all sides of hydroperoxide group.



Scheme 2. Fragmentation scheme for main volatiles from hydroperoxides of mono-unsaturated compounds



Scheme 3. Fragmentation scheme for main volatiles from di-hydroperoxides of poly-unsaturated compounds

IV- CONCLUSION

We have shown that electron-riche terpenoids are easily oxidized by singlet oxygen to form tertiary and secondary hydroperoxides. Mono-hydroperoxides are rapidly formed whatever the mono, di or tri-unsaturated compounds studied but the presence of an allylic ester group significantly decreases the reactivity of the double bond.

The combination of complementary analytical methods such as NMR and mass spectrometry enables the identification and the quantification of volatile compounds from hydroperoxide thermolysis. Whatever the method used (monitoring in real time or at analysis of cumulative products), the first and major product is always acetone. Methacrolein is the second one monitored for all hydroperoxides degraded. The nature of the VOCs are in agreement with the formation and the reaction of alkoxy radicals as extensively reported for the degradation of unsaturated fatty acid hydroperoxides.

Acknowledgements

This work was performed within Ph.D. project funded by Unilever based in Portsunlight in Great Britain. We thank Julien Leprevost and Hubert Latappy for analytical B-trap mass spectrometry.

References

1. J.B. Christensson, S. Johansson, L. Hagvall, C. Jonsson, A. Börje and A.-T. Karlberg, Limonene hydroperoxide analogues differ in allergenic activity. *Contact Dermatitis*, **2008**, 59(6): 344-352.
2. L. Hagvall, C. Bäcktorp, S. Svensson, G. Nyman, A. Börje and A.-T. Karlberg, Fragrance Compound Geraniol Forms Contact Allergens on Air Exposure. Identification and Quantification of Oxidation Products and Effect on Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.*, **2007**, 20(5): 807-814.
3. C. Bäcktorp, L. Hagvall, A. Borje, A.-T. Karlberg, P.-O. Norrby and G. Nyman, Mechanism of Air Oxidation of the Fragrance Terpene Geraniol. *J. Chem. Theory Comput.*, **2007**, 4(1): 101-106.
4. G. Ohloff, E. Klein and G.O. Schenck, Preparation of "Rose Oxides" and other hydropyran derivatives by way of photohydroperoxides. *Angew. Chem.*, **1961**, 73: 578.
5. R.M. Alonso-Salces, M.V. Holland and C. Guillou, 1H-NMR fingerprinting to evaluate the stability of olive oil. *Food Control*, **2011**, 22(12): 2041-2046.
6. P.L. Alsters, W. Jary, V.r. Nardello-Rataj and J.-M. Aubry, "Dark" Singlet Oxygenation of β -Citronellol: A Key Step in the Manufacture of Rose Oxide. *Org. Process Res. Dev.*, **2009**, 14(1): 259-262.
7. F. Shahidi, and Y. Zhong, Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39(11): 4067-4079.
8. G. Procida, A. Cichelli, D. Compagnone, R. Maggio, L. Cerretani and M. Del Carlo, Influence of chemical composition of olive oil on the development of volatile compounds during frying. *Eur Food Res Technol*, **2009**, 230(2): 217-229.
9. K.M. Schaich, Lipid Oxidation: Theoretical Aspects, in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. **2005**, John Wiley & Sons, Inc.
10. S. Krishnamurthy, and H.C. Brown, Selective reductions. 31. Lithium triethylborohydride as an exceptionally powerful nucleophile. A new and remarkably rapid methodology for the hydrogenolysis of alkyl halides under mild conditions. *J. Org. chem.*, **1983**, 48: 3085-91.
11. J. Corey Elias, A.K., A method for deoxygenation of allylic and benzylic alcohols. *J. Org. Chem.*, **1969**, 34(11): 3667-3668.
12. P.C. Gascon Ignacio, Marty Jean-Daniel, Mingotaud Christophe, Example of an organic reaction in a Langmuir film: Reduction of an amphiphilic ketone by NaBH₄. *J. Colloid Interface Sci.*, **2005**, 289(2): 574-580.
13. J.M. Aubry, Search for singlet oxygen in the decomposition of hydrogen peroxide by mineral compounds in aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107: 5844-9.
14. V. Nardello, S. Bogaert, P.L. Alsters and J.-M. Aubry, Singlet oxygen generation from H₂O₂/MoO₄²⁻: peroxidation of hydrophobic substrates in pure organic solvents. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43(48): 8731-8734.

15. N. Garnier, C. Rolando, J.M. Høtje and C. Tokarski, Analysis of archaeological triacylglycerols by high resolution nanoESI, FT-ICR MS and IRMPD MS/MS: Application to 5th century BC–4th century AD oil lamps from Olbia (Ukraine). *Int. J. Mass spectrom.*, **2009**. *284(1–3)*: 47-56.
16. S. Sarrabi, X. Colin, A. Tcharkhtchi, M. Heninger, J. Leprovost and H. Mestdagh, Real Time Analysis of Volatile Organic Compounds from Polypropylene Thermal Oxidation Using Chemical Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal Chem*, **2009**. *81(15)*: 6013-6020.
17. T.A. Cooper, and W.A. Waters, Oxidations of organic compounds by cobaltic salts. III. Oxidation of aromatic aldehydes. *J. Chem. Soc.*, **1964**: 1538-43.
18. W.A. Waters, The kinetics and mechanism of metal-catalyzed autoxidation. *J Am Oil Chem Soc*, **1971**. *48(9)*: 427-433.
19. C.E.H. Bawn, J.E. Jolley, The Cobalt-Salt-Catalyzed Autoxidation of Benzaldehyde. *P. Roy. Soc. Lond. A Mat.*, **1956**. *237(1210)*: 297-312.
20. C. E. H. Bawn, J.J.E., The Cobalt-Salt-Catalyzed Autoxidation of Benzaldehyde. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, **1956**. *237(1210)*: 297-312.
21. C. E. H. Bawn, H.T.P., Raphael L., The Metal-Salt-Catalyzed Oxidation of Acetaldehyde. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, **1956**. *237(1210)*: 313-324.
22. M.C. DeRosa, R.J. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**. *233–234(0)*: 351-371.
23. A. Khan, M. Kasha, Red chemiluminescence of oxygen in aqueous solution. *J. Chem. Phys.*, **1963**. *39*: 2105-6.
24. A.M. CaMinade, F.E. Khatib, M. Koenig and J.M. Aubry, Ozonides de phosphite source d'oxygène singulet: rendement, mécanisme. *Can. J. Chem.*, **1985**. *63(11)*: 3203-3209.
25. J.-M. Aubry, C. Pierlot, J. Rigaudy and R. Schmidt, Reversible Binding of Oxygen to Aromatic Compounds. *Acc. Chem. Res.*, **2003**. *36(9)*: 668-675.
26. V. Nardello, M.J., Vermeersch G., Aubry J. M., 90Mo NMR and kinetic studies of peroxomolybdic intermediates involved in the catalytic disproportionation of hydrogen peroxide by molybdate ions. *Inorg. Chem.*, **1995**. *34*: 4950-7.
27. V. Nardello, M.J., Vermeersch G., Aubry J. M., 183W NMR Study of Peroxotungstates Involved in the Disproportionation of Hydrogen Peroxide into Singlet Oxygen (1O_2 , $^1\Delta_g$) Catalyzed by Sodium Tungstate in Neutral and Alkaline Water. *Inorg. Chem.*, **1998**. *37(21)*: 5418-5423.
28. V. Nardello, K. Briviba, H. Sies and J.-M. Aubry, Identification of the precursor of singlet oxygen (1O_2 , $^1\Delta_g$) involved in the disproportionation of hydrogen peroxide catalyzed by calcium hydroxide. *Chem. Comm. (Cambridge)*, **1998**: 599-600.
29. V. Nardello, J. Barbillat, J. Marko, P.T. Witte, P.L. Alsters and J.-M. Aubry, Lanthanum(III)-Catalyzed Disproportionation of Hydrogen Peroxide: A Heterogeneous Generator of Singlet Molecular Oxygen— 1O_2 ($^1\Delta_g$)—in Near-Neutral Aqueous and Organic Media for Peroxidation of Electron-Rich Substrates. *Chem. – Eur. J.*, **2003**. *9(2)*: 435-441.

30. J.M. Aubry, S. Bouttemy, Preparative Oxidation of Organic Compounds in Microemulsions with Singlet Oxygen Generated Chemically by the Sodium Molybdate/Hydrogen Peroxide System1. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**. *119*(23): 5286-5294.
31. C. Tanielian, J. Chaineaux, Singlet oxygen reactions with model compounds of cis and trans polyisoprene containing two units. *J. Photochem.*, **1978**. *9*(1): 19-32.
32. C. Tanielian, R. Mechin, Reactions of singlet oxygen with polyisoprene and model compounds. *Tetrahedron*, **1985**. *41*(11): 2139-2146.
33. F.L. D’Alexandri, F.C. Gozzo, M.N. Eberlin and A.M. Katzin, Electrospray ionization mass spectrometry analysis of polyisoprenoid alcohols via Li⁺ cationization. *Anal. Biochem.*, **2006**. *355*(2): 189-200.
34. C. Tanielian, J. Chaineaux, Sensitized photo-oxidation of polyisoprene: effect of the presence of hydroxy and hydroperoxy groups. *Eur. Polym. J.*, **1980**. *16*(7): 619-622.
35. E. N. Frankel, N.W.E., Selke E., Brooks D. D., Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: X. Volatile thermal decomposition products of methyl linolenate dimers. *Lipids*, **1988**. *23*(4): 295-298.
36. J.B. Christensson, P. Forsström, A.-M. Wennberg, A.-T. Karlberg and M. Matura, Air oxidation increases skin irritation from fragrance terpenes. *Contact Dermatitis*, **2009**. *60*(1): 32-40.
37. J. Kostal, A. Voutchkova-Kostal, B. Weeks, J.B. Zimmerman and P.T. Anastas, A Free Energy Approach to the Prediction of Olefin and Epoxide Mutagenicity and Carcinogenicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **2012**. *25*(12): 2780-2787.
38. G. Gallet, S. Carroccio, P. Rizzarelli and S. Karlsson, Thermal degradation of poly(ethylene oxide-propylene oxide-ethylene oxide) triblock copolymer: comparative study by SEC/NMR, SEC/MALDI-TOF-MS and SPME/GC-MS. *Polymer*, **2002**. *43*(4): 1081-1094.
39. E.N. Frankel, Lipid oxidation. *Prog. Lipid Res.*, **1980**. *19*(1-2): 1-22.
40. E. Choe, D.B. Min, Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr. Rev. Food Sc. F.*, **2006**. *5*(4): 169-186.
41. E.N. Frankel, W.E. Neff and E. Selke, Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry. IX. Homolytic vs. Heterolytic cleavage of primary and secondary oxidation products. *Lipids*, **1984**. *19*(10): 790-800.
42. W.E. Neff, E.N. Frankel and D. Weisleder, Photosensitized oxidation of methyl linolenate. Secondary products. *Lipids*, **1982**. *17*(11): 780-790.
43. E.J. Corey, K. Achiwa, A method for deoxygenation of allylic and benzylic alcohols. *J. Org. Chem.*, **1969**. *34*: 3667-8.
44. I. Gascon, C. Patrascu, J.-D. Marty and C. Mingotaud, Example of an organic reaction in a Langmuir film: Reduction of an amphiphilic ketone by NaBH₄. *J. Colloid Interface Sci.*, **2005**. *289*: 574-580.

Supporting Information

MS-FTICR analysis of volatiles released by thermolysis of singlet oxygenated terpenoids

Delphine BLONDE¹, Stéphanie DELBAERE², Caroline TOKARSKI³, Craig JONES⁴, Jean-Marie AUBRY^{1*}, Véronique NARDELLO-RATAJ^{1*}

¹ *Université Lille Nord de France, EA 4478 Chimie Moléculaire et Formulation, Cité scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France*

² *Faculté des sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de physique et d'application RMN, 3 rue du professeur Laguesse, BP 83, 59006 Lille cedex, France*

³ *Université Lille Nord de France, MSAP USR 3290, 59652 Villeneuve d'Ascq, France*

⁴ *Unilever PLC, Port Sunlight Laboratory, Bebington, Wirral CH63 3JW, United-Kingdom*

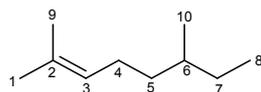
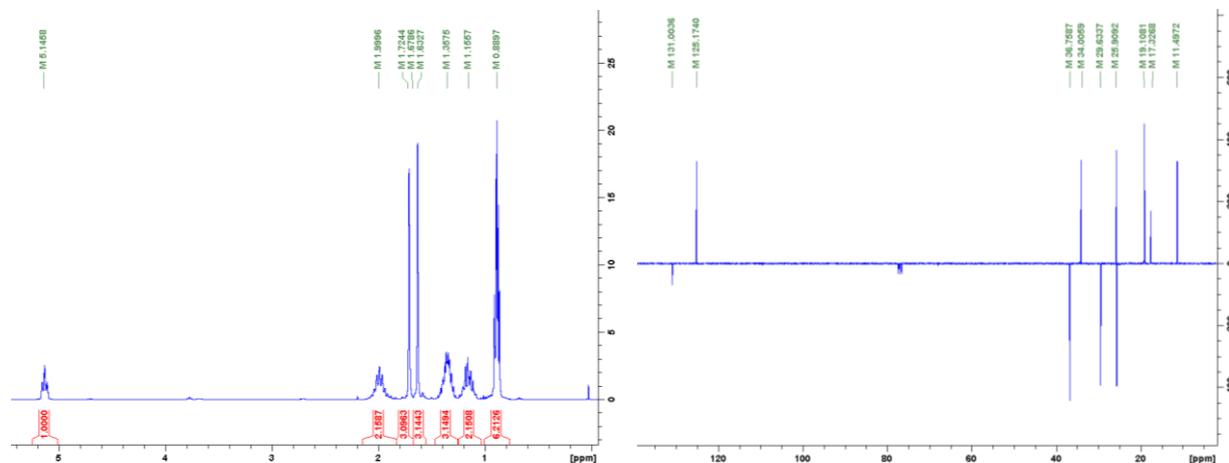
Synthesis of compounds 1a, 1b and 1c	S1
Synthesis of compounds 1c, 2c and 3c	S2
Yield for each hydroperoxide formed by photooxidation in dichloromethane with TPP	S3
HPLC conditions for the detection of the terpenes and terpenoids 1-6	S4
Terpene and terpenoid hydroperoxides – NMR description	S5
Writing of possible hydroperoxides from geranyl acetate and 2,6-dimethyl-2,6-octadiène	S6
Writing of possible mono- and di-hydroperoxides from farnesyl acetate and 2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodécatriène.	S7
B-trap time profile vs NMR spectrum of the VOC emissions from terpene and terpenoid hydroperoxide thermal degradation	S8

S1: Synthesis of compounds 1a, 2a and 3a

2,6-dimethyl-2-octene 1a: β -citronellol (15.6 g, 100 mmol, 0.5 mol.L⁻¹), CH₂Cl₂ (Verbiese) (200 mL) and NEt₃ (Aldrich) (9 g, 110 mmol) were mixed at 0 °C. TsCl (20 g, 105 mmol, 0.5 mol.L⁻¹) was added by portions at 0 °C, then the mixture was stirred at room temperature for 2 days. Solvent was evaporated and 200 mL ether was added. The NEt₃HCl salts were washed with water and the solution was dried with magnesium sulphate. Then, ether (200 mL) was cooled with glace bath and LiAlH₄ (1.9 g) was introduced by portions. The solution of tosylate was added dropwise and the new reaction mixture is heated at 40 °C at refluxed during 6 hours. The excess of LiAlH₄ was destroyed by hydrolysis with water at 0 °C. The reaction was carried out under argon.

After reaction, LiAlH₄ salts were filtered using Buchner (with cotton), the solution was dried with magnesium sulphate, solvents were evaporated. The product was purified by distillation. Yield = 30%. Purity = $\geq 99 \pm 5\%$ determined by ¹H NMR and GC.

NMR description

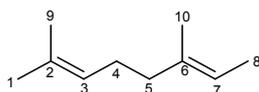
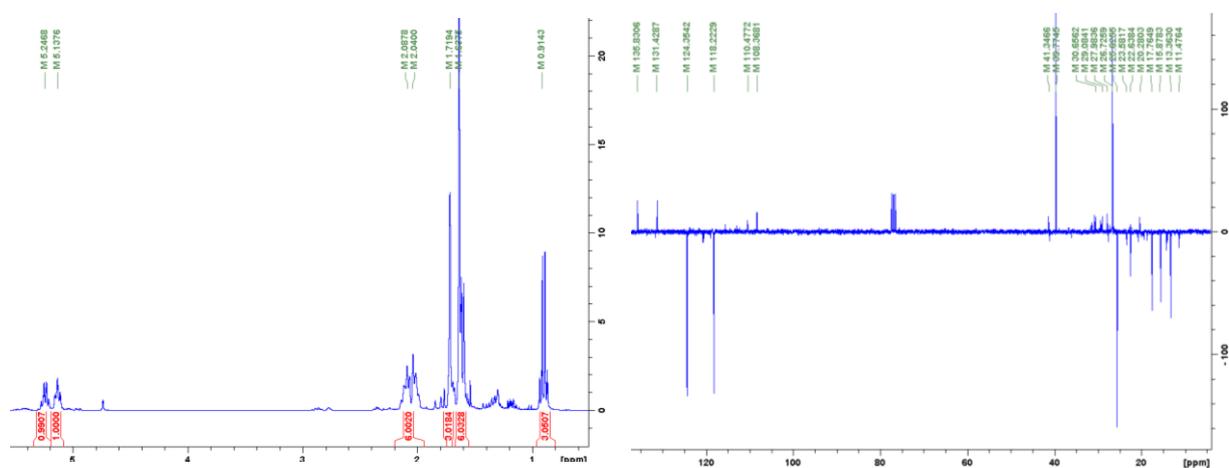


δ_H (300 MHz, CDCl₃) 5.14 (1H, t_a, $J = 6.8$ Hz, 3-H), 2.04-1.92 (2H, m, 4-H), 1.72 (3H, s, 1-H or 9-H), 1.63 (3H, s, 1-H or 9-H), 1.41-1.29 (3H, m, 6-H and 7-H or 5-H), 1.21-1.09 (2H, m, 5-H or 7-H), 0.88 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, 8-H), 0.87 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 10-H).

δ_c (75 MHz, CDCl_3) 131.0 (C, C-2), 127.2 (CH, C-3), 36.7 (CH_2 , C-5), 34.0 (CH, C-6), 29.6 (CH_2 , C-7), 25.9 (CH_3 , C-1), 25.9 (CH_2 , C-4), 19.1 (CH_3 , C-10), 17.3 (CH_3 , C-9), 11.5 (CH_3 , C-8).

2,6-dimethyl-2,6-octadiène (49%) 2a and **2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodecatriène (25%) 3a** were synthesized according to the procedure of Corey⁴³ with the following modifications: after reaction, LiAlH_4 salts were filtered using Buchner (with cotton), the solution was dried with magnesium sulphate, solvents were evaporated. The product was purified on silica gel chromatography using petroleum ether as eluant. Purity = $\geq 90 \pm 5\%$ determined by ^1H NMR and GC.

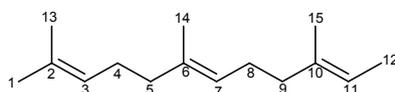
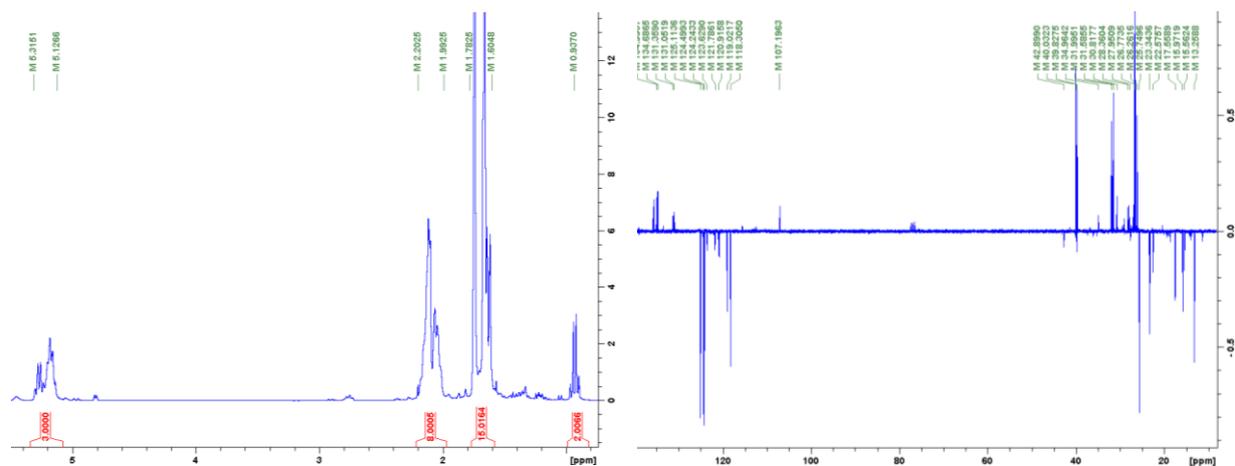
NMR description



δ_H (300 MHz, CDCl_3) 5.27 (1H, q, $J = 6.1$ Hz, 7-H), 5.16 (1H, t, $J = 6.5$ Hz, 3-H), 2.17-2.02 (4H, m, 4-H and 5-H), 1.73 (3H, s, 10-H), 1.66-1.62 (9H, m, 1-H, 8-H and 9-H).

δ_c (75 MHz, CDCl_3) 135.68 (C, 6-C), 131.18 (C, 2-C), 124.35 (CH, 3-C), 118.30 (CH, 7-C), 40.21 (CH_2 , 5-C), 26.70 (CH_2 , 4-C), 25.77 (CH_3 , 1-C), 17.54 (CH_3 , 10-9), 15.52 (CH_3 , 9-C), 13.35 (CH_3 , 8-C).

2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodecatriene (mixture of stereoisomers)



δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 5.23 (1H, q, $J = 6.5$ Hz, 11-H), 5.18-5.10 (2H, m, 3-H and 7-H), 2.14-1.97 (8H, m, 4-H, 5-H, 8-H and 9-H), 1.71 (6H, s_a), 1.63 (6H, s_a), 1.60 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, 12-H), 0.93 (2H, q, $J = 7.8$ Hz).

Representative signals

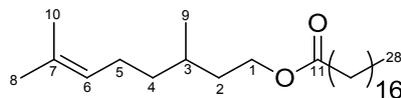
δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) 135.8 (C), 134.9 (C), 131.4 (C), 125.1 (CH), 124.4 (CH), 119.1 (CH), 118.3 (CH), 41.5 (CH_2), 39.9 (CH_2), 32.0 (CH_2), 26.7 (CH_2), 25.5 (CH_3), 23.3 (CH_3), 17.7 (CH_3), 15.9 (CH_3), 14.0 (CH_3).

S2: Synthesis of compounds 1c, 2c and 3c

General procedure for the synthesis of terpenoid stearate 1c, 2c, 3c were synthesized according to the procedure of Gascon⁴⁴ with the following modifications: in a three-necked flask, alcohol (citronellol, geraniol or farnesol – 2 equivalents) was mixed with 50 mL of dichloromethane. Then, 4 equivalents of triethylamine were added. The stearyl chloride was separately mixed in 20 mL of dichloromethane and added dropwise in alcohol-solvent mixture, under magnetic stirring during 24 hours at room temperature. At the end, products were controlled by TLC. Solvent was evaporated and product was recovered thanks to 150 mL of diethyl ether. The mixture was washed with water several times. The solution was dried with magnesium sulphate and solvent evaporated. To finish, the product was purified by silica column.

NMR description

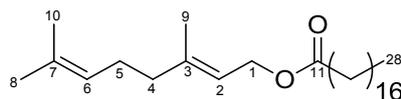
Citronellyl stearate



δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 5.09 (1H, t_{a} , $J = 7.0$ Hz, 6-H), 4.18-4.05 (2H, m, 1-H), 2.29 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, 12-H); 2.04-1.94 (2H, m, 5-H), 1.82 (3H, s, 8-H or 10-H), 1.69 (3H, s, 10-H or 8-H), 1.62 (3H, s, 8-H or 10-H), 1.50-1.21 (35H, m), 0.92 (3H, t, $J = 6.4$ Hz, 28-H).

δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 174.74 (C, 11-C), 131 (C, 7-C), 124.23 (CH, 6-C), 62.68 (CH_2 , 1-C), 36.74 (CH_2 , 4-C), 35.59 (CH_2 , 2-C), 34.21 (CH_2 , 12-C), 31.91 (CH_2 , 26-C), 29.62 (CH_2 , 15-C to 25-C), 29.6 (CH, 3-C), 26.40 (CH_3 , 8-C), 25.25 (CH_2 , 5-C), 22.27 (CH_2 , 27-C), 19.28 (CH_3 , 9-C), 17.91 (CH_3 , 10-C), 15.15 (CH_3 , 28-C)

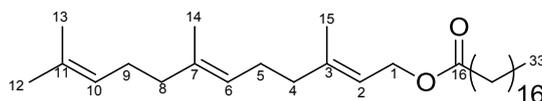
Geranyl stearate



δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 5.34 (1H, t_{a} , $J = 6.9$ Hz, 2-H), 5.08 (1H, t_{a} , $J = 6.7$ Hz, 6-H), 4.61 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, 1-H), 2.30 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, 12-H), 2.14 – 2.02 (4H, m, 4-H and 5-H), 1.71 (3H, s), 1.69 (3H, s), 1.65-1.58 (2H, m), 1.61 (3H, s), 1.34-1.23 (28 H, s), 0.89 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, 28-H)

δ_c (75 MHz, $CDCl_3$) 174.0 (C, 11-C), 141.9 (C, 3-C), 131.9 (C, 7-C), 123.7 (CH, 6-C), 118.7 (CH, 2-C), 61.3 (CH_2 , 1-C), 39.4 (CH_2 , 4-C), 34.5 (CH_2 , 12-C), 31.4 (CH_2 , 26-C), 29.4 (CH_2 , 14-C and 15-C), 26.3 (CH_2 , 5-C), 26, 0 (CH_3 , 8-C), 25.0 (CH_2 , 13-C), 22.4 (CH_2 , 27-C), 17.9 (CH_3 , 10-C), 16.2 (CH_3 , 9-C), 14.2 (CH_3 , 28-C)

Farnesyl stearate



δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 5.36 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, 2-H), 5.14-5.05 (2H, m, 6-H and 10-H), 4.57 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, 1-H), 2.30 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, 17-H), 2.13-1.94 (8H, m, 4-H 5-H 8-H and 9-H), 1.70 (3H, s), 1.68 (3H,s), 1.60 (6H, s_a), 1,34-1.20 (28H, m), 0.88 (3H, t, $J = 6.6$ Hz,33-H)

δ_c (75 MHz, $CDCl_3$) 173.80 (C, 16-C), 142.18 (C, 3-C), 135.91 (C, 7-C), 131.21 (C, 11-C), 124.32 (2 CH, 6-C et 10-C), 119.63 (CH, 2-C), 61.69 (CH_2 , 1-C), 40.08 (2 CH_2 , 4-C et 8-C), 35.07 (CH_2 , 17-C), 31.94 (CH_2 , 32-C), 29.75 (CH_2 , 19-C to 31-C), 26,7 (CH_2 , 5-C and 9-C), 25.67 (CH_2 , 18-C), 22.86 (CH_2 , 32-C); 18.16 (CH_3 , 13-C), 16.28 (CH_3 , 14-C and 15-C), 13.78 (CH_3 , 33-C)

**S3: Yield for each hydroperoxide formed by photooxidation
in methylene chloride with TPP**

R-OOH	Yield
2,6-dimethyl-2-octene 1a	99%
2,6-dimethyl-2,6-octadiene 2a	99%
2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodecatriene 3a	98%
Citronellyl acetate 1b	99%
Geranyl acetate 2b	99%
Farnesyl acetate 3b	99%
Citronellyl stearate 1c	82%
Geranyl stearate 2c	90%
Farnesyl stearate 3c	70%

S4: HPLC conditions for the detection of the terpenes and terpenoids 1-6

Substrate	Eluant (%)
2,6-dimethyl-2-octene 1a	80 MeOH – 20 H ₂ O
2,6-dimethyl-2,6-octadiene 2a	80 MeOH – 20 H ₂ O
2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodecatriene 3a	90 MeOH – 10 H ₂ O
Citronellyl acetate 1b	80 MeOH – 20 H ₂ O
Geranyl acetate 2b	80 MeOH – 20 H ₂ O
Farnesyl acetate 3b	80 MeOH – 20 H ₂ O
Citronellyl stearate 1c	100 CH ₃ CN
Geranyl stearate 2c	100 CH ₃ CN
Farnesyl stearate 3c	100 CH ₃ CN

S5: Terpene and terpenoid hydroperoxides – NMR description

All peroxidated compounds are mixture of isomer hydroperoxides.

Citronellol hydroperoxides

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) δ 8.24 (1H, s), 8.14 (1H, s), 7.81 (1H, s), 5.73 (1H, t, $J = 6.9$ Hz), 5.67 (1H, t, 6.8 Hz), 5.59 (1H, t, $J = 0.84$ Hz), 5.53 (1H, t, $J = 1$ Hz), 5.04-5.00 (2H, m), 4.30 (1H, t, $J = 6.9$ Hz), 3.76-3.63 (m, 2H), 2.06 (2H, t, $J = 8.7$ Hz), 2.00 (2H, t, $J = 9.5$ Hz), 1.96 (2H, t, $J = 5.02$ Hz), 1.75 (3H, s), 1.35 (6H, s), 0.93 (3H, d, $J = 4.24$ Hz), 0.91 (3H, d, $J = 4.4$ Hz).

2,6-dimethyl-2-octene hydroperoxides 1a

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 7.93 (s, 1H), 7.4 (s, 1H), 5.72 (1H, t, $J = 7.4$ Hz), 5.67 (1H, t, $J = 7.1$ Hz), 5.5 (2H, s), 5.50 (2H, s), 4.30 (1H, t, $J = 6.6$ Hz), 2.1-2.05 (1H, m), 1.94-1.85 (1H, m), 1.74 (6H, s), 1.26 (2H, m), 0.91-0.83 (3H, m)

δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 143.6 (C), 134.6 (CH), 131.1 (CH), 114.6 (CH_2), 90.1 (CH), 82.5 (C), 39.5 (CH_2), 34.5 (CH), 32.7 (CH_2), 28.2 (CH_2), 24.4 (CH_3), 19.3 (CH_3), 14.2 (CH_3), 12.1 (CH_3)

Citronellyl acetate hydroperoxides 1b

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 8.39 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 5.67 (1H, t, $J = 6.65$ Hz), 5.62 (1H, t, $J = 6.65$ Hz), 5.58 (1H, t, $J = 15.82$ Hz), 5.02-4.94 (2H, m), 4.27 (1H, t, $J = 6$ Hz), 4.14-4.03 (2H, m), 2.04 (3H, s), 2.01-1.90 (2H, m), 1.74 (3H, s), 1.33 (6H, s), 0.92 (3H, d, $J = 4.71$ Hz), 0.89 (3H, d, $J = 4.87$ Hz).

δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 143.7 (CH_2), 135.6 (CH), 129.9 (CH), 114.6 (C), 90.2 (CH), 82.2 (C), 63.0 (CH_2), 39.1 (CH_2), 35.3 (CH_2), 32.9 (CH_2), 29.6 (CH), 28.0 (CH_2), 24.6 (CH_3), 21.0 (CH_3), 19.9 (CH_3), 17.1 (CH_3)

Citronellyl stearate hydroperoxides 1c

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 8.41 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 5.67 (1H, t, $J = 5.6$ Hz), 5.62 (1H, t, $J = 6.25$ Hz), 5.59 (1H, t, $J = 16.32$ Hz), 5.29 (1H, s), 5.02-4.94 (2H, m), 4.26 (1H, t, $J = 6.1$ Hz), 4.17-4.02 (2H, m), 2.27 (2H, t, $J = 7.7$ Hz), 2.12-1.9 (2H, m), 1.71 (3H, s), 1.33 (3H, s), 1.31-1.21 (32H, m), 0.93-0.84 (6H, m).

δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 174.7 (C), 144.1 (C), 135.4 (CH), 129.5 (CH), 114.5 (CH_2), 89.6 (CH), 82.0 (C), 62.8 (CH_2), 39.3 (CH_2), 35.4 (CH_2), 35.3 (CH_2), 34.9 (CH_2), 34.4 (CH_2), 32.7 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.2 (CH_2), 29.1 (CH_2), 28.1 (CH_2), 27.9 (CH_2), 24.8 (CH_2), 24.3 (CH_3), 22.6 (CH_2), 19.5 (CH_3), 19.4 (CH_3), 19.3 (CH_3), 17.0 (CH_3), 14.1 (CH_3).

Geraniol hydroperoxides

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 5.71-5.61 (1H, m), 5.56 (1H, s), 5.46-5.38 (1H, m), 5.01-4.96 (1H, m), 4.28 (1H, t, $J = 6.7$ Hz), 4.16 (2H, d, $J = 7.02$ Hz), 3.74-3.69 (2H, m), 2.74 (2H, d, $J = 6.02$ Hz), 2.06 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.76-1.71 (3H, m), 1.68-1.64 (3H, m), 1.32 (6H, s).

2,6-dimethyl-2,6-octadiene hydroperoxides 2a

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 8.88-8.63 (1H, m), 8.45-8.19 (1H, m), 5.98-5.56 (1H, m), 5.25 (1H, t_a), 5.23-5.18 (2H, m), 5.04-4.97 (1H, m), 4.56-4.45 (1H, m), 4.43-4.26 (1H, m), 2.94-2.75 (2H, m), 2.71 (2H, d, $J = 5.76$ Hz), 2.52-2.33 (2H, m), 2.22-1.94 (3H, m), 1.74 (3H, d, $J = 7.06$ Hz), 1.70-1.56 (2H, m), 1.35-1.30 (6H, m), 1.29 (3H, s), 1.27 (2H, t, $J = 3.7$ Hz).

δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 148.2 (C), 147.9 (C), 147.3 (C), 143.7 (C), 143.4 (C), 140.6 (CH), 137.0 (CH), 135.5 (CH), 129.5 (CH), 126.2 (CH), 115.8 (C), 115.7 (C), 114.4 (C), 114.2 (C), 114.0 (C), 112.5 (C), 112.2 (C), 89.4 (CH), 89.1 (CH), 88.6 (CH), 84.8 (CH), 84.6 (CH), 84.4 (CH), 84.3 (C), 84.2 (C), 82.2 (C), 82.1 (C), 40.2 (CH₂), 34.5 (CH₂), 32.5 (CH₂), 28.8 (CH₂), 27.0 (CH₂), 26.5 (CH₂), 24.6 (CH₂), 24.4 (CH₃), 24.3 (CH₃), 24.1 (CH₃), 21.5 (CH₃), 21.5 (CH₃), 17.5 (CH₃), 17.4 (CH₃), 17.3 (CH₃), 17.2 (CH₃).

Geranyl acetate hydroperoxides 2b

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 9.52 (1H, s), 8.82 (1H, s), 8.64 (1H, s), 8.08 (1H, s), 7.28 (1H, d, $J = 3.5$ Hz), 5.72-5.61 (1H, m), 5.58 (1H, d, $J = 3.67$ Hz), 5.55 (1H, d, $J = 2.34$ Hz), 5.50 (1H, d, $J = 2.24$ Hz), 5.36 (1H, t_a), 5.13 (1H, d, $J = 5.10$ Hz), 5.09 (2H, s), 5.01 (2H, s), 4.59 (2H, d, $J = 7$ Hz), 4.41-4.31 (1H, m), 4.28 (1H, t, $J = 6.5$ Hz), 2.77 (2H, d, $J = 4.8$ Hz), 2.13 (3H, s), 2.06 (2H, d, $J = 1.8$ Hz), 1.76-1.68 (4H, m), 1.35-1.32 (6H, m)

δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 171.5 (C), 143.6 (C), 142.7 (C), 141.6 (C), 140.7 (C), 137.7 (CH), 137.5 (CH), 136.3 (CH), 135.9 (CH), 128.1 (CH), 127.8 (CH), 119.2 (CH), 118.5 (CH), 117.4 (CH), 115.7 (C), 114.3 (C), 89.0 (CH), 88.8 (CH), 88.6 (CH), 88.4 (CH), 85.1 (CH), 84.7 (CH), 81.8 (C), 62.8 (C), 61.7 (C), 42.3 (CH₂), 41.1 (CH₂), 36.6 (CH₂), 35.2 (CH₂), 33.3 (CH₂), 31.1 (CH₃), 29.1 (CH₂), 24.5 (CH₃), 22.2 (CH₃), 21.0 (CH₃), 20.9 (CH₃), 20.7 (CH₃), 17.0 (CH₃), 16.5 (CH₃), 16.4 (CH₃).

Geranyl stearate hydroperoxides 2c

δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 9.24 (1H, s), 8.64 (1H, s), 7.286 (1H, d, $J = 3.5$ Hz), 5.70-5.57 (1H, m), 5.35 (1H, t_a), 5.03-4.96 (2H, s), 4.58 (2H, d, $J = 6.9$ Hz), 4.26 (1H, t, $J = 6.95$ Hz), 2.79-2.74 (2H, m), 2.28 (2H, t_a), 2.25-2.12 (2H, m), 1.76-1.67 (2H, m), 1.65-1.55 (2H, m), 1.36 (6H, s), 1.31-1.21 (32H, m), 0.9 (3H, t, $J = 6.95$ Hz).

δ_c (75 MHz, $CDCl_3$) 207.9 (C), 175.0 (C), 174.1 (C), 171.1 (C), 143.7 (C), 142.8 (C), 141.3 (C), 140.4 (C), 137.9 (CH), 137.3 (CH), 136.5 (CH), 135.9 (CH), 127.9 (CH), 125.6 (CH), 119.3 (CH), 118.9 (CH), 117.5 (CH), 115.6 (C), 113.9 (C), 89.9 (CH), 88.7 (CH), 88.5 (CH), 88.3 (CH), 84.9 (CH), 84.7 (CH), 82.2 (C), 81.8 (C), 81.7 (C), 62.3 (CH_2), 61.1 (CH_2), 42 (CH_2), 40.8 (CH_2), 36.7 (CH_2), 36.4 (CH_2), 35.5 (CH_2), 35.4 (CH_2), 35.4 (CH_2), 34.3 (CH_2), 34.1 (CH_2), 33.9 (CH_2), 31.9 (CH_2), 30.8 (CH_3), 29.6 (CH_2), 26.4 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.1 (CH_2), 39.1 (CH_2), 28.6 (CH_2), 24.9 (CH_2), 24.8 (CH_2), 24.5 (CH_2), 24.3 (CH_3), 22.6 (CH_2), 22.0 (CH_3), 21.8 (CH_3), 17.2 (CH_3), 17.1 (CH_3), 16.9 (CH_3), 16.4 (CH_3), 16.3 (CH_3), 14.1 (CH_3).

2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodecatriene hydroperoxides 3a

δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 5.98-5.51 (1H, m), 5.31-5.17 (1H, m), 5.13 (2H, s), 5.02 (2H, s), 4.55 – 4.27 (1H, m), 2.94-2.69 (2H,), 2.54-2.33 (2H, m), 2.16-1.93 (3H, m), 1.80-1.72 (3H, m), 1.71-1.54 (2H, m), 1.36-1.30 (3H, m).

Farnesyl acetate hydroperoxides 3b

δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 5.79-5.53 (1H, m), 5.41-5.31 (1H, m), 5.14-5.06 (1H, m), 5.08-4.97 (2H, m), 4.57 (2H, d, $J = 8$ Hz), 4.41-4.22 (1H, m), 2.86-2.82 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.10 (3H, s), 2.05 (3H, s), 1.75 (2H, d, $J = 7.63$ Hz), 1.69 (3H, s), 1.34-1.29 (6H, m).

Farnesyl stearate hydroperoxides 3c

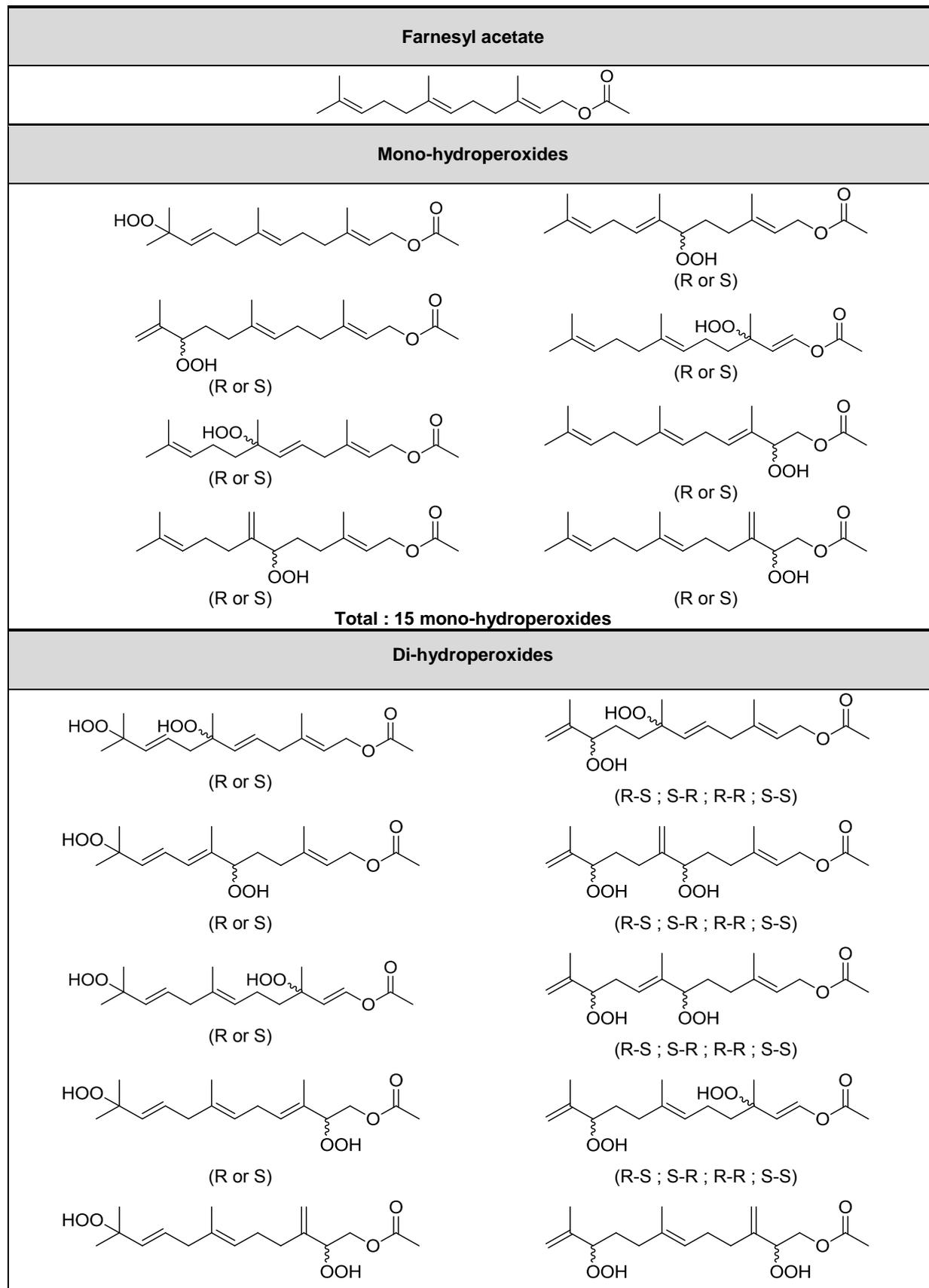
δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 5.80-5.49 (1H, m), 5.36 (1H, t_a), 5.16-5.09 (2H, m), 5.07-4.99 (2H, m), 4.60 (2H, d, $J = 7.10$ Hz), 4.41-4.25 (1H, m), 2.94-2.81 (2H, m), 2.82-2.75 (2H, m), 2.47-2.35 (2H, m), 2.30 (2H, t, $J = 8.1$ Hz), 2.14-2.02 (2H, m), 1.79-1.72 (3H, m), 1.71 (3H, s), 1.69-1.55 (3H, m), 1.35-1.19 (32H, m), 0.88 (3H, t, $J = 6$ Hz).

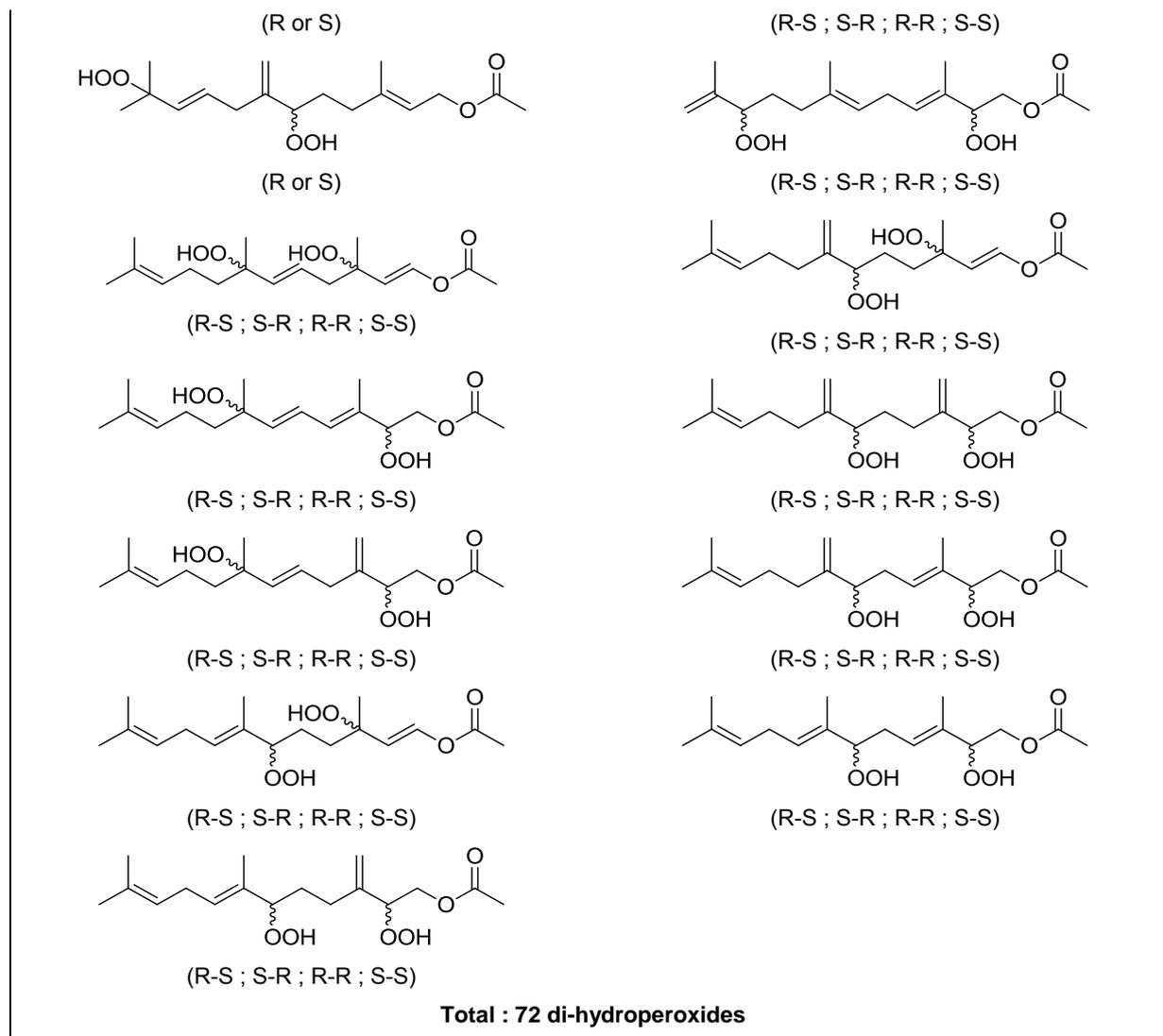
S6: Writing of possible hydroperoxides from geranyl acetate and 2,6-dimethyl-2,6-octadiène.

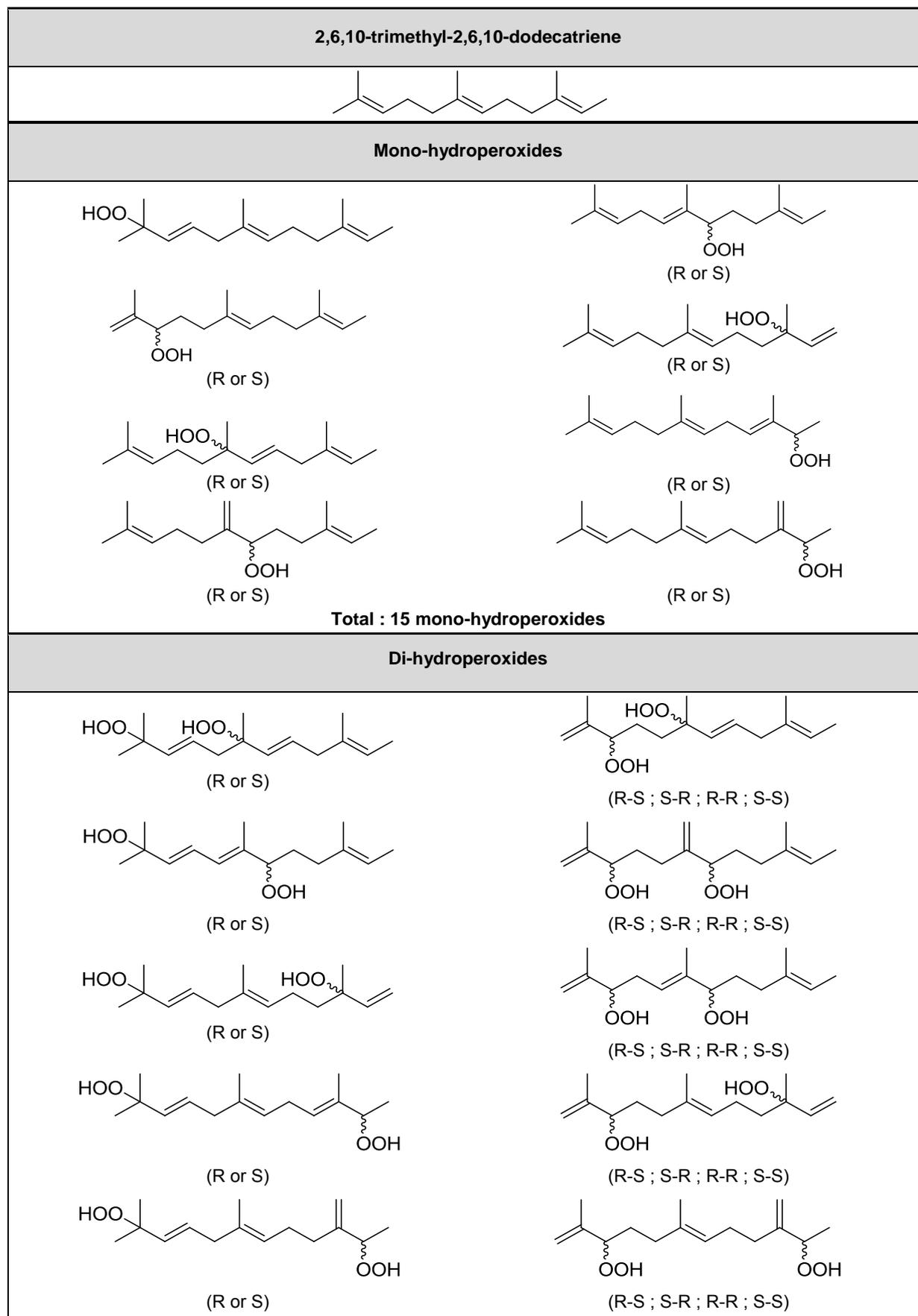
Geranyl acetate	
Mono-hydroperoxides	
<p>(R or S)</p>	<p>(R or S)</p>
<p>(R or S)</p>	<p>(R or S)</p>
<p>Total : 9 mono-hydroperoxides</p>	
Di-hydroperoxides	
<p>(R or S)</p>	<p>(R-S ; S-R ; R-R ; S-S)</p>
<p>(R or S)</p>	<p>(R-S ; S-R ; R-R ; S-S)</p>
<p>(R or S)</p>	<p>(R-S ; S-R ; R-R ; S-S)</p>
<p>Total : 18 di-hydroperoxides</p>	

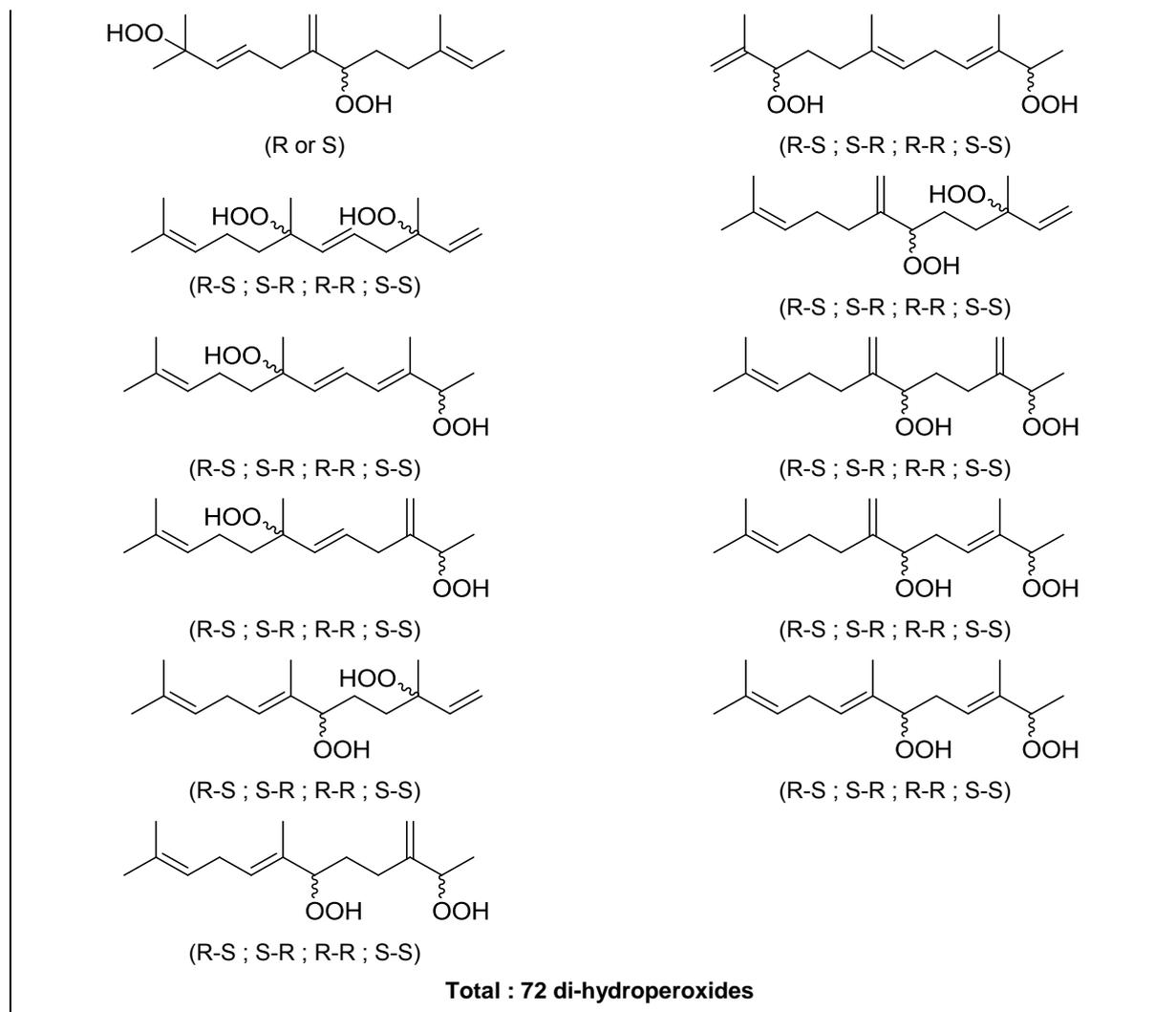
2,6-dimethyl-2,6-octadiene	
Mono-hydroperoxides	
<p>OOH (R or S)</p>	<p>HOO (R or S)</p>
<p>HOO</p>	<p>OOH (R or S)</p>
	<p>OOH (R or S)</p>
Total : 9 mono-hydroperoxides	
Di-hydroperoxides	
<p>HOO (R or S)</p>	<p>OOH OOH (R-S ; S-R ; R-R ; S-S)</p>
<p>HOO (R or S)</p>	<p>OOH OOH (R-S ; S-R ; R-R ; S-S)</p>
<p>HOO (R or S)</p>	<p>HOO (R-S ; S-R ; R-R ; S-S)</p>
Total : 18 di-hydroperoxides	

S7 : Writing of possible mono- and di-hydroperoxides from farnesyl acetate and 2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodécatriène.



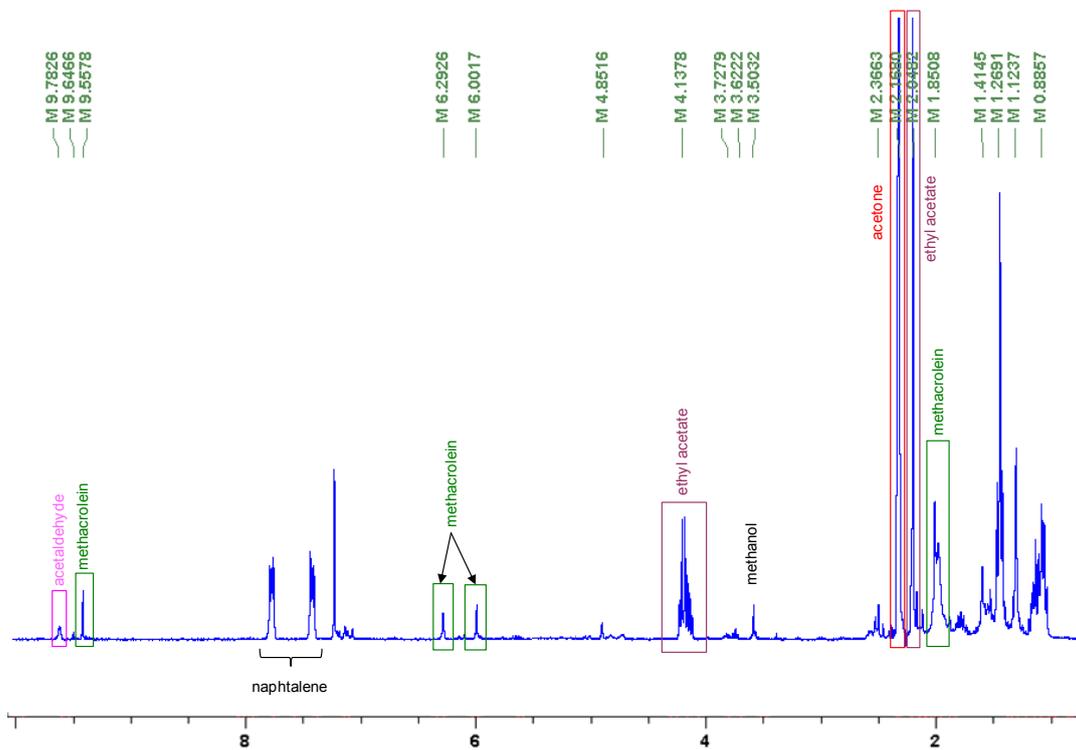
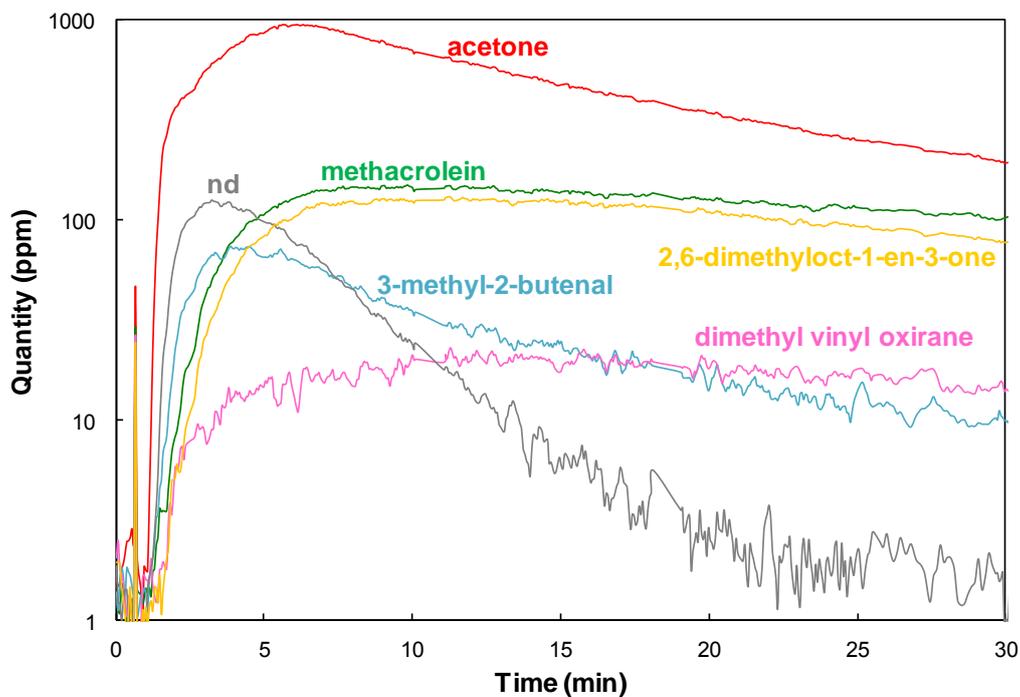




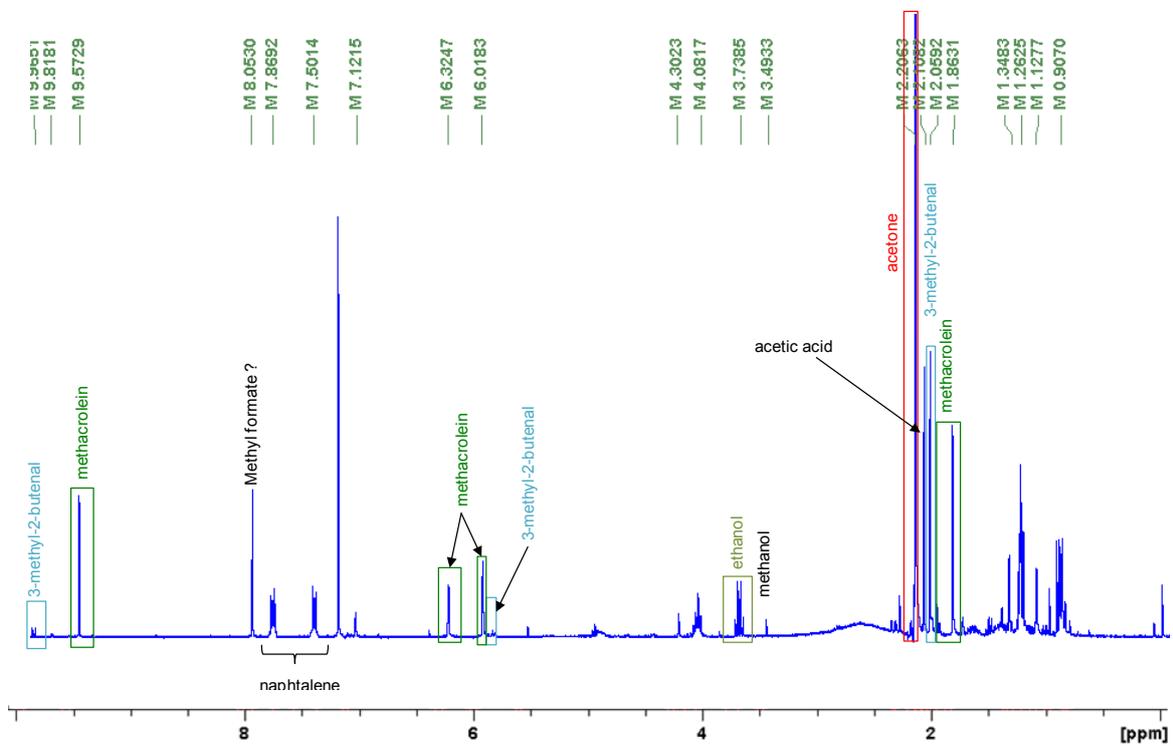
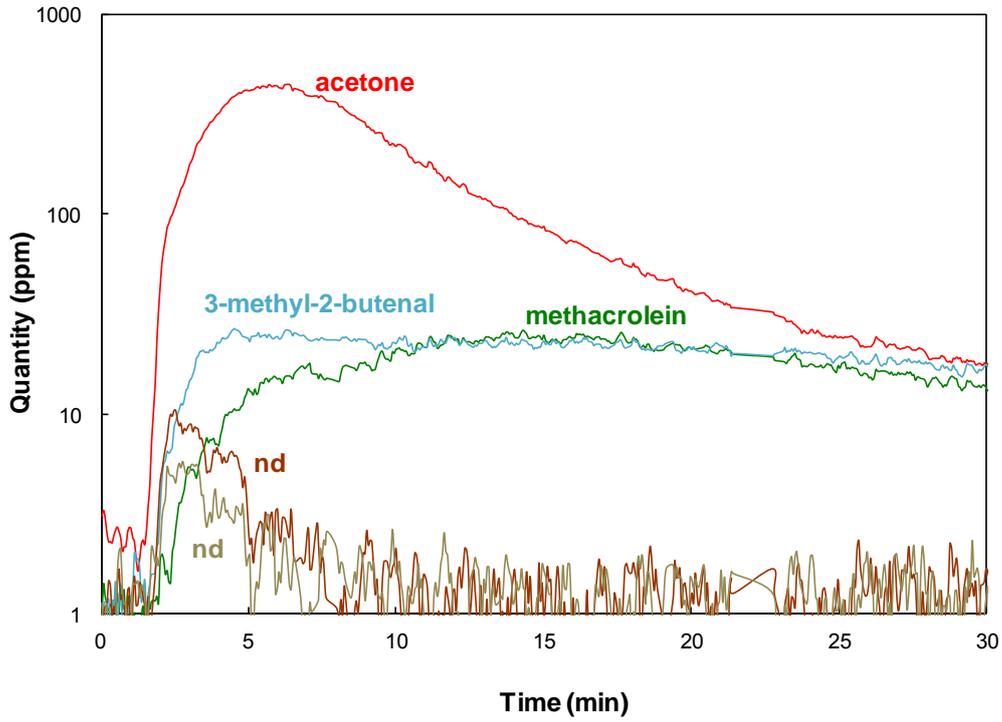


S8: B-trap time profile vs NMR spectrum of the VOC emissions from terpene and terpenoid hydroperoxide thermal degradation

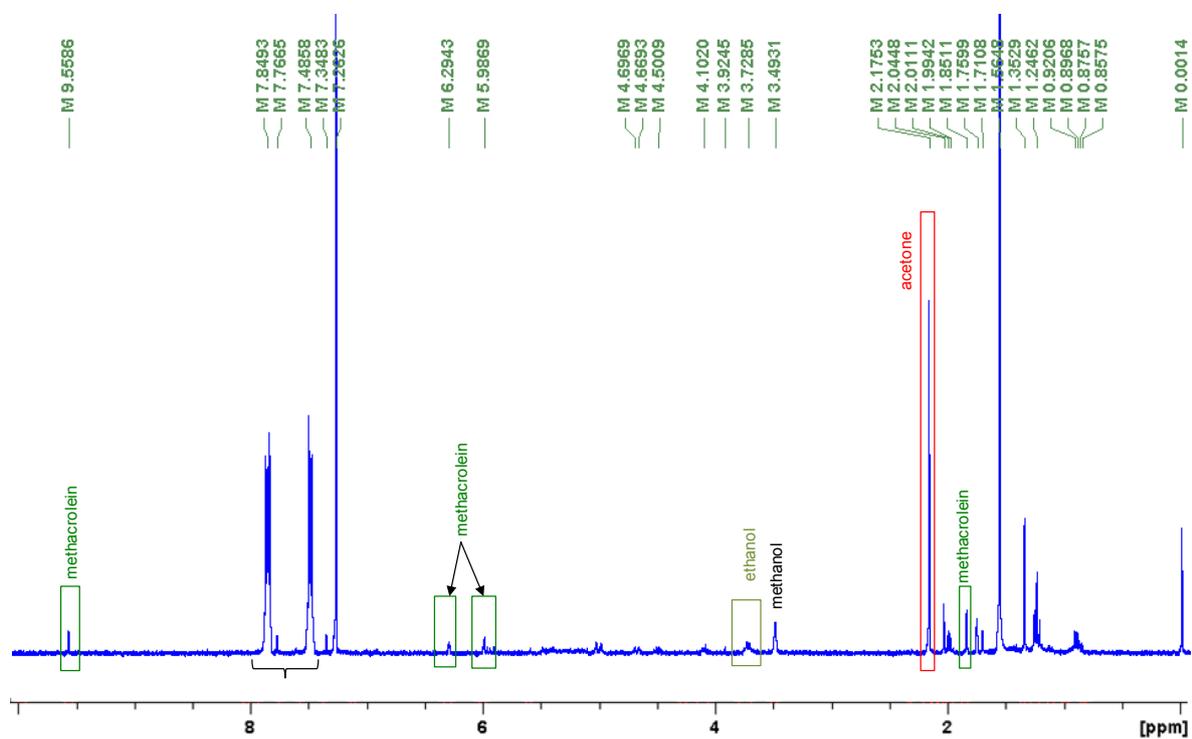
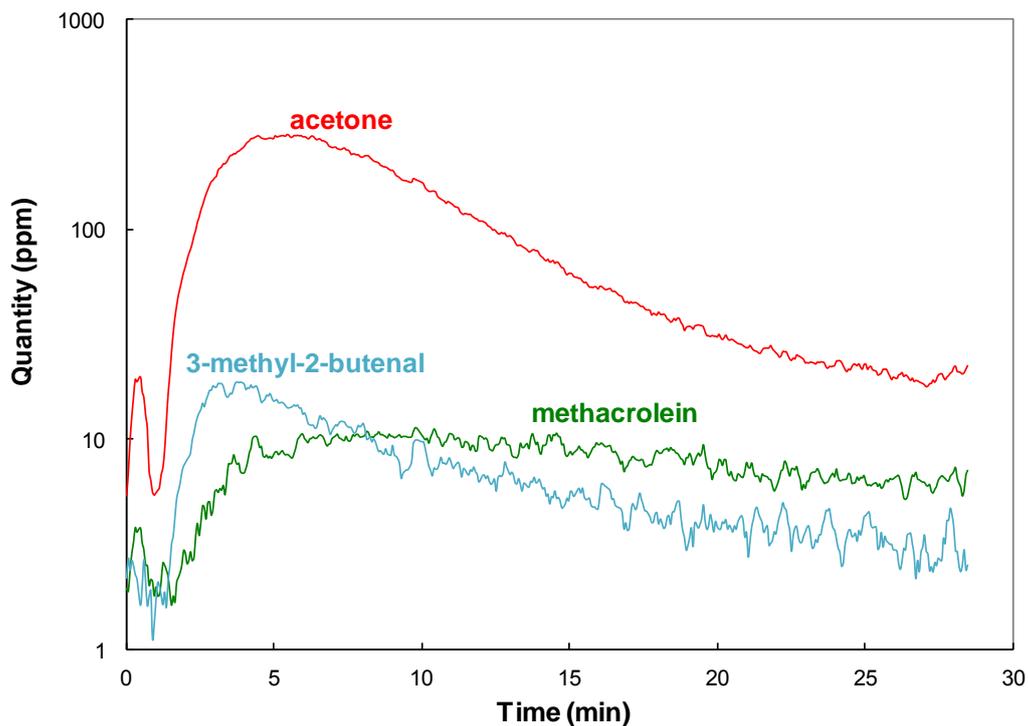
2,6-dimethyl-2-octene hydroperoxide degradation



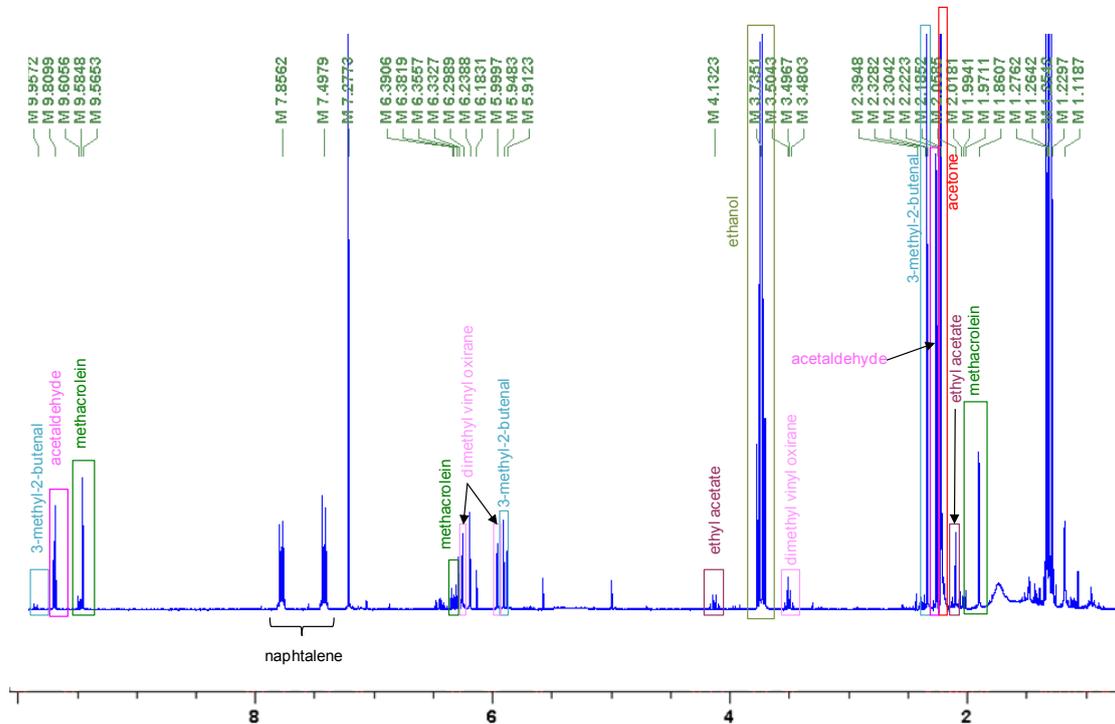
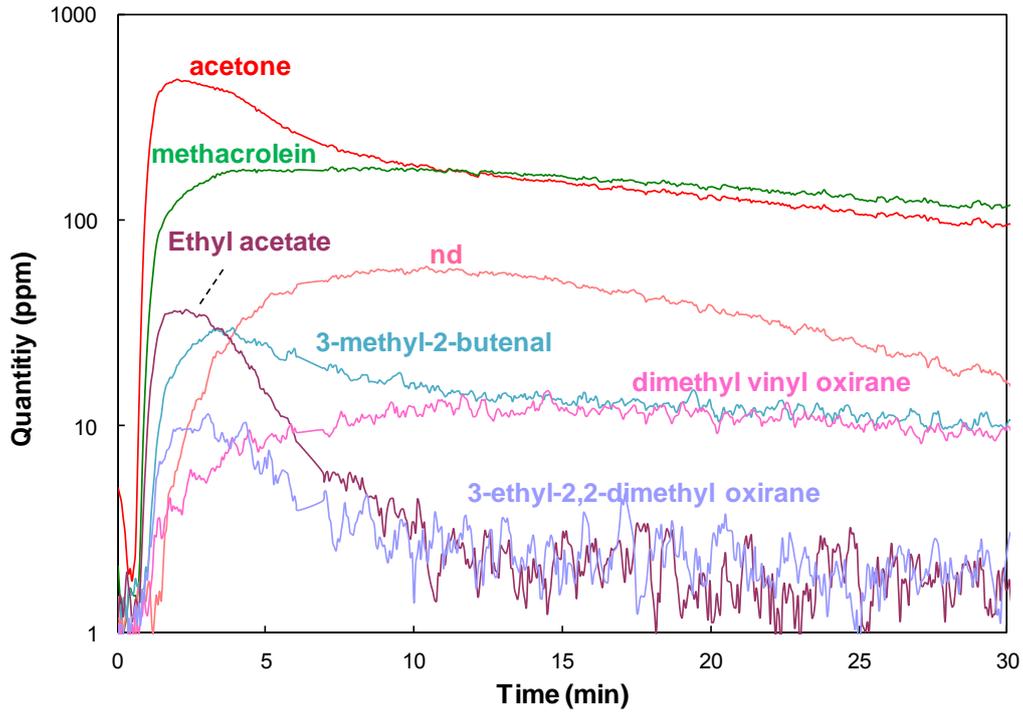
Citronellyle acetate hydroperoxide degradation



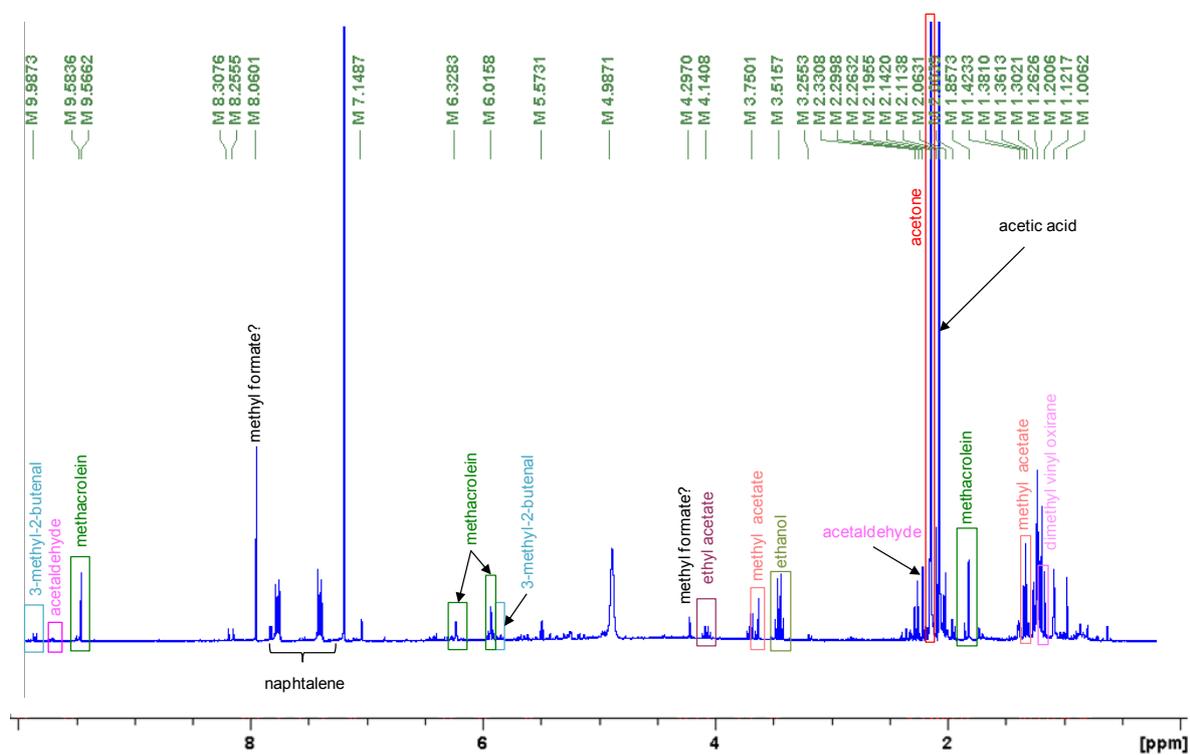
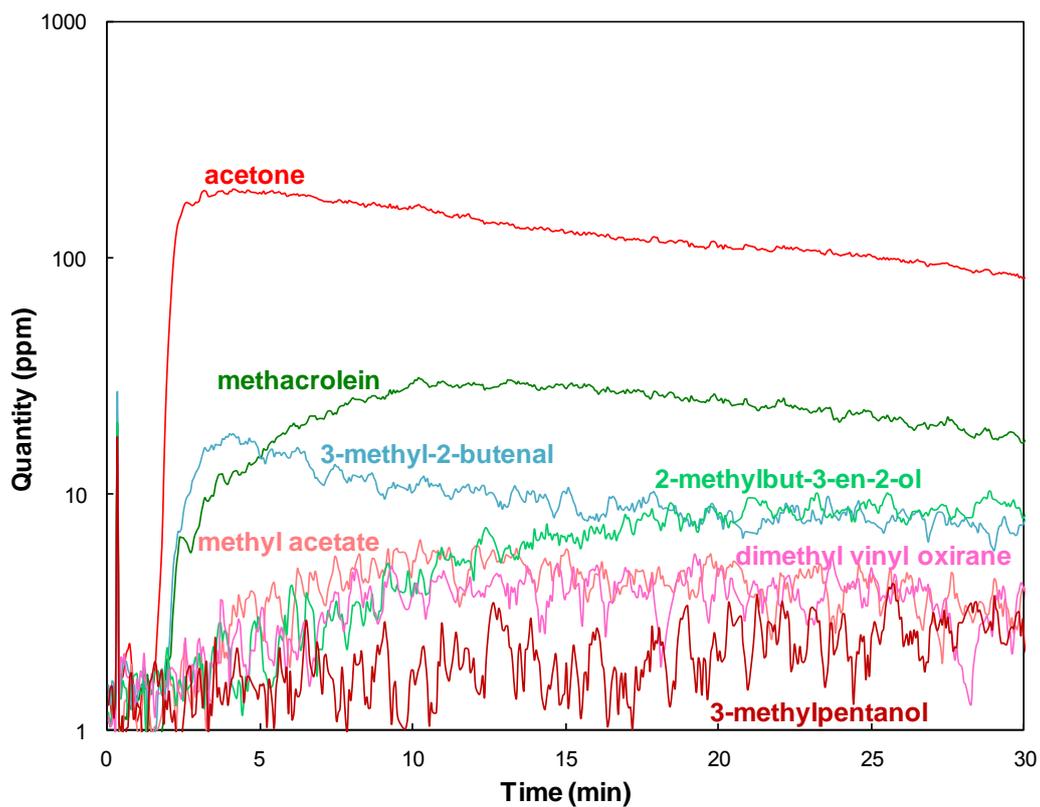
Citronellyle stearate hydroperoxide degradation



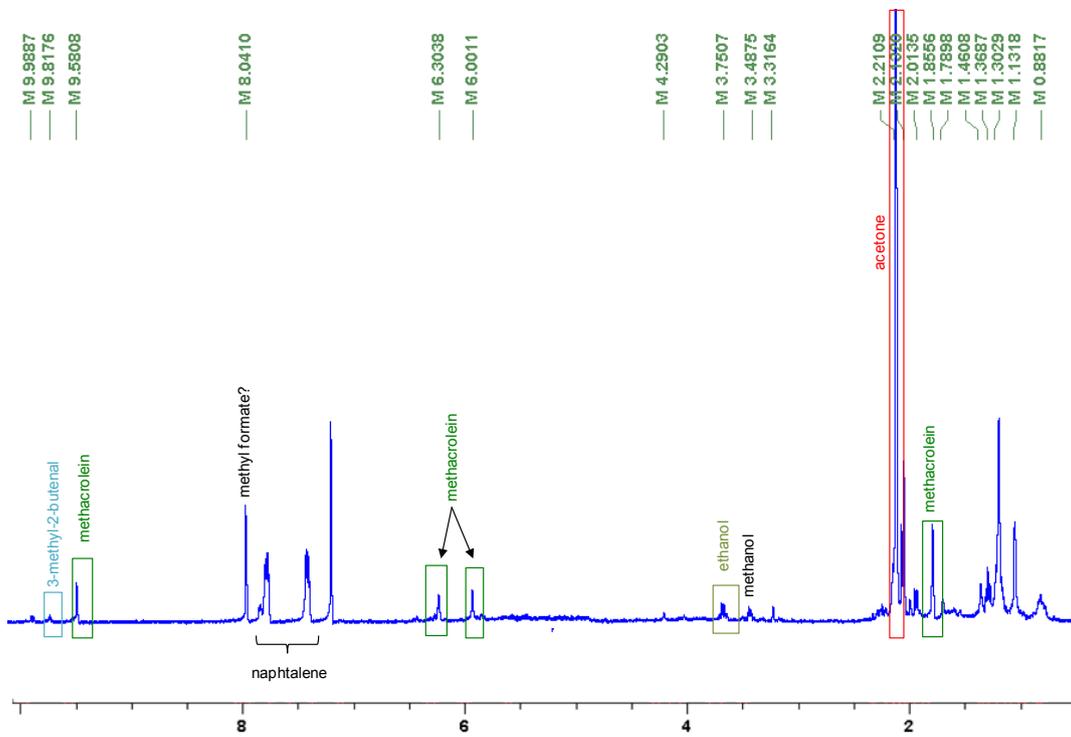
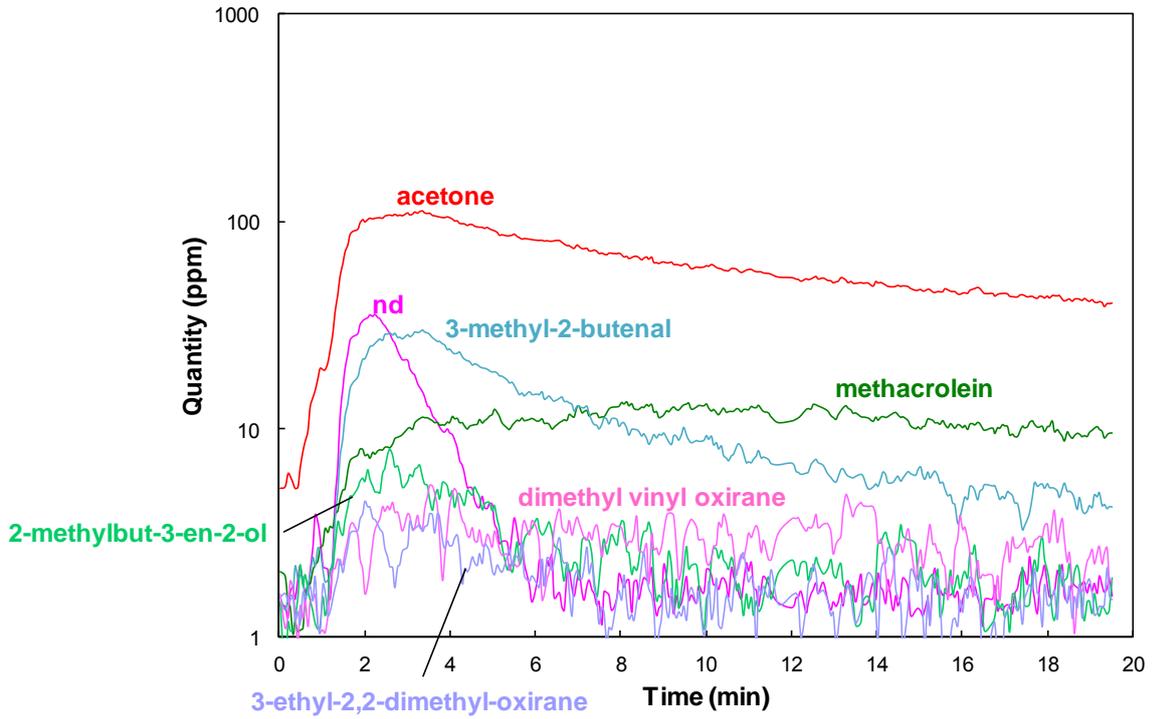
2,6-dimethyl-2,6-octadiene hydroperoxide degradation



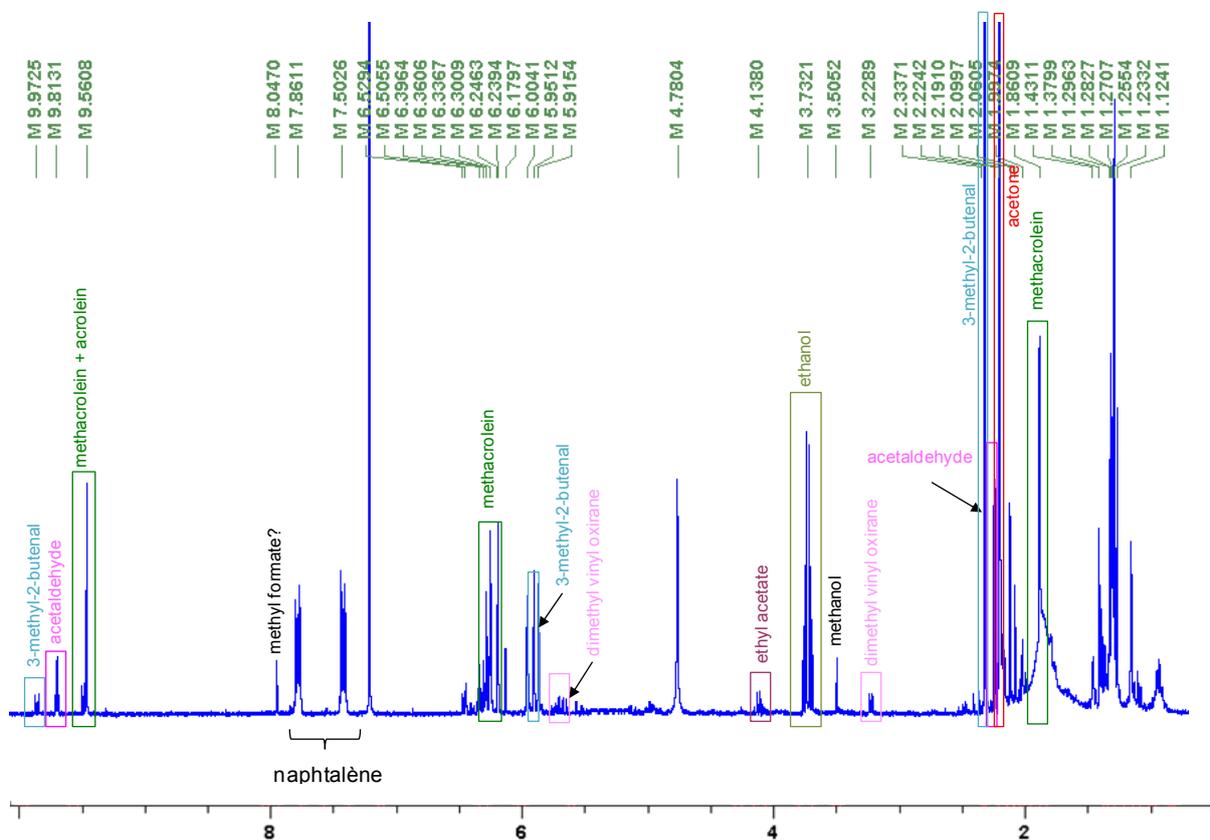
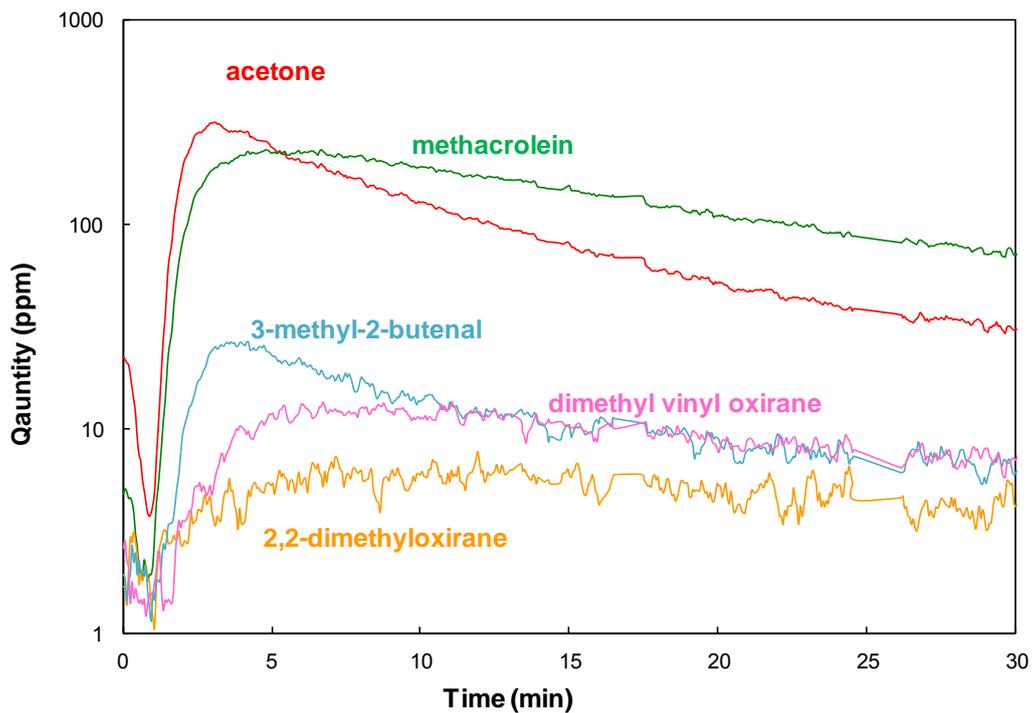
Geranyl acetate hydroperoxide degradation



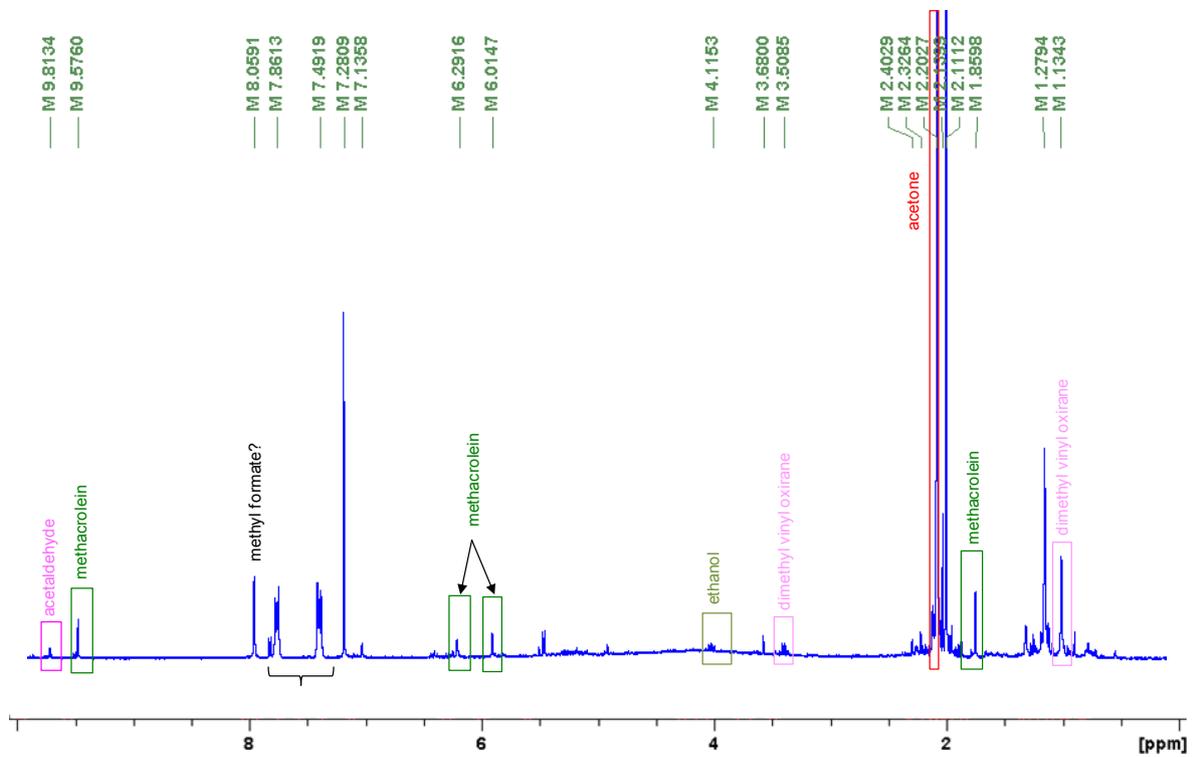
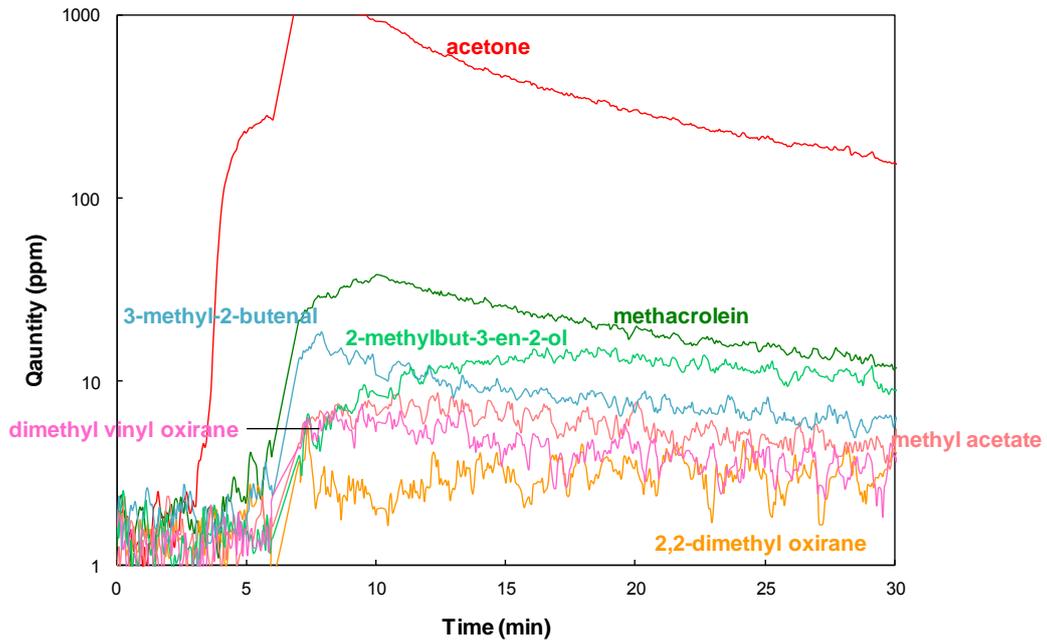
Geranyl stearate hydroperoxide degradation



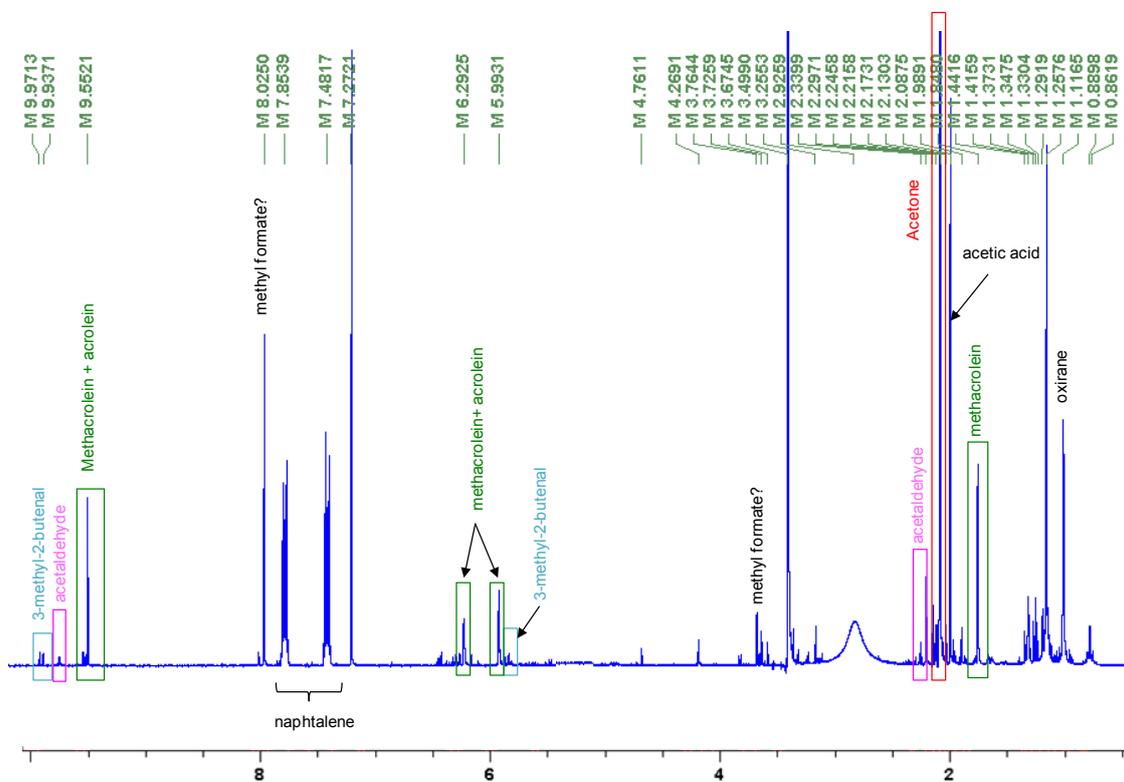
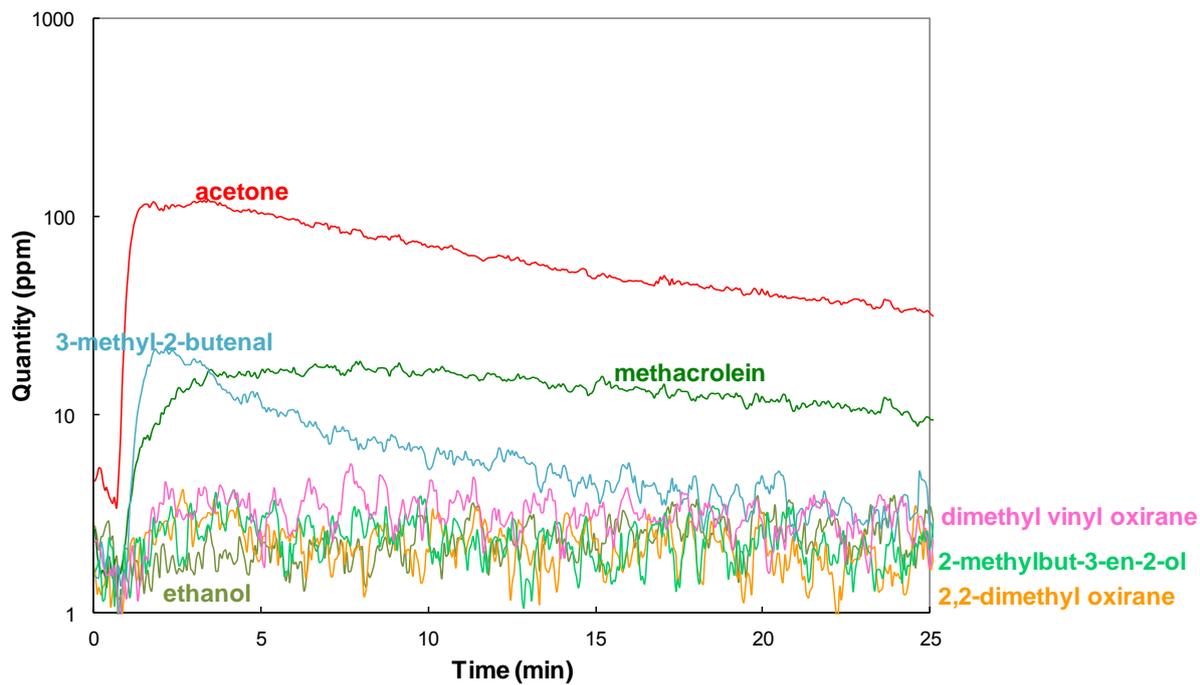
2,6,10-trimethyl-2,6,10-dodecatriene hydroperoxide degradation



Farnesyle acetate hydroperoxide degradation



Farnesyle stearate hydroperoxide degradation



Chapitre IV

Dégradation des Hydroperoxydes de Squalène par Voies Catalytique et Enzymatique

Introduction

Les agents de blanchiment sont des composés ou des systèmes ayant pour fonction de décolorer des salissures absorbant dans le visible par un processus d'oxydation ou de réduction des chromophores, soit en les dégradant, soit en les rendant solubles à l'eau ou encore en déplaçant leur spectre d'absorption hors de la région du visible.

Les principales espèces chimiques utilisées sont des composés chlorés (ClO^-), H_2O_2 , l'ozone ou encore des peracides.¹ La suppression des chromophores consomme plus de 60% de la production mondiale de peroxyde d'hydrogène (50 % pour le papier et 10 % pour le textile). En effet, le peroxyde d'hydrogène est probablement un des meilleurs oxydants, après le dioxygène, respectant simultanément les contraintes environnementales et économiques.² Cependant, les technologies existantes ont des limites. Dans la lessive, les doses élevées de produits nécessaires ainsi que les températures de lavage requises pour déclencher l'action de ces oxydants limitent leur application aux marchés principalement européens et exclut la majorité des populations mondiales. Aujourd'hui l'un des principaux défis dans le domaine de la détergence consiste à tenter d'éliminer une grande variété de tâches tout en respectant les fibres textiles et en diminuant l'énergie à fournir.¹ Pour cela, un certain nombre de facteurs ont besoin d'être améliorés : **1)** abaissement de la température du lavage, **2)** remplacement par le peroxyde d'hydrogène des oxydants chlorés qui produisent des déchets halogénés, **3)** le remplacement des précurseurs de peracides (TAED par exemple) par une combinaison H_2O_2 /catalyseur afin de réduire le nombre de composés utilisés. Cependant, le peroxyde d'hydrogène ayant une cinétique d'oxydation trop lente à température modérée ($< 80^\circ\text{C}$), il est nécessaire de l'activer.¹

Naturellement, certaines enzymes activent des processus d'oxydation ou la dégradation de composés organiques à température modérée. Dans la voie de la lipoxygénase des plantes, les hydroperoxyde-lyases dégradent les peroxydes d'acide gras par clivage de liaison C-C, libérant des volatils aux fragrances vertes. Des enzymes contenant des espèces à base de fer sont fortement impliquées dans l'activation de processus à base d'oxygène.³⁻⁷ Ainsi, une famille d'enzymes, les cytochromes P450, est même capable de cliver des liaisons C-H non-actives,⁸⁻¹⁰ c'est pourquoi de nombreux groupes de recherche se sont penchés sur la compréhension des mécanismes mis en jeu (*European Journal of Inorganic Chemistry, Chemical Reviews, Journal of Inorganic Biochemistry, The Journal of Physical Chemistry...*).

Afin de répondre toujours plus aux attentes des consommateurs et aux exigences des réglementations, de nombreuses recherches ont été entreprises pour élucider les mécanismes d'action de ces catalyseurs naturels afin de les adapter aux impératifs industriels. Ainsi, des catalyseurs à base de ligands pentadentés ont vu le jour tel que $\text{Fe-MeN}_4\text{Py}$ et Fe-bispidon . L'objectif de ce chapitre est de

transposer l'activité de ces agents de blanchiment catalytique ou biochimique à l'étude de la dégradation des hydroperoxydes de squalène.

IV.1. Dégradation des hydroperoxydes de squalène par voie catalytique

IV.1.1. Introduction

La compréhension des mécanismes d'activation de l'oxygène impliqués dans l'oxydation des hydrocarbures par les catalyseurs hémiques et non hémiques⁶ fascinent les biochimistes et les chimistes bio inorganiciens depuis de nombreuses années.¹¹ En plus des études biologiques, les dix dernières années ont vu le développement de complexes ferreux synthétiques, visant à mimer les réactions catalytiques observées dans les oxygénases non hémiques.¹² Les études se sont plus particulièrement focalisées sur les complexes (L)Fe^{II} où le ligand L est tétradenté (L_{4N} - 4 liaisons covalentes avec le métal central) ou pentadenté (L_{5N} - 5 liaisons covalentes avec le métal central), avec des ensembles donneurs amine/pyridine. Ces catalyseurs ont montré une haute activité oxydante des alcanes et des oléfines en présence de peroxyde d'hydrogène,¹³ d'hydroperoxydes ou de réactifs donneurs d'oxygène.¹⁴ Ainsi, nous nous sommes concentrés sur 2 de ces complexes ferreux : de type N₄Py (figure 1) et bispidone (figure 2), fournis par la société Unilever.

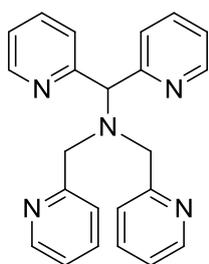


Figure 1 : Structure chimique d'un ligand de type N₄Py.

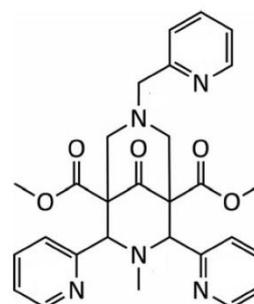


Figure 2 : Structure chimique d'un ligand de type bispidone.

A l'origine, les complexes ferreux de la classe N₄Py ont été étudiés comme catalyseurs d'oxydation par Ben Feringa (Université de Goeningen) et Larry Que Jr. (Université du Minnesota), au cours d'une thèse financée par Unilever en 2000.¹⁵ Un autre complexe dérivé du ligand N₄Py, le MeN₄Py (numéroté **1**) a été développé en partenariat avec la même société pour être utilisé en tant qu'agent de blanchiment, et plus spécifiquement pour améliorer la stabilité des ligands sous les conditions de détergence (température, pH élevé). Un brevet, déposé par Unilever, couvre l'application des complexes métalliques coordonnés avec N₄Py ou ses dérivés en combinaison avec le peroxyde

d'hydrogène.¹⁶ Des composés apparentés tels que Fe-MeN₄Py sont également cités dans le brevet car ils permettent la décoloration des tâches en activant l'oxygène de l'air. L'émergence de tels composés fonctionnant avec O₂ est relativement nouvelle et la majorité des études publiées concernent l'activation du peroxyde d'hydrogène et la détermination du rendement d'époxyde et de diols formés sur un substrat mono-insaturé.¹⁷⁻²⁰ En 2001, l'action des couples catalyseurs/O₂/chaines grasses insaturées a également été protégée par Unilever.²¹ Ce nouveau brevet couvre la décoloration des salissures hydrophobes par l'air et explique que la réactivité sur ces tâches est en fait due à la présence d'hydroperoxydes.¹

Les ligands dérivés de bispidone appartiennent à une autre classe de complexes à base de fer, avec 5 N donneurs, brevetés également pour le blanchiment des tâches.²² Ces composés sont capables d'éliminer les salissures de tomates et de curry seulement grâce à l'oxygène de l'air.¹ Ces catalyseurs à base de bispidone, dont le « stainless » (**2**) en est un exemple, ont été mis au point par Peter Comba à l'université d'Heidelberg²³⁻²⁵ et Unilever a déposé la majorité des brevets protégeant leurs applications. Cependant, de récents brevets concernant leur utilisation dans les revêtements ont été déposés par d'autres sociétés telles que *OMG additives*²⁶ ou *PPG*.²⁷

Le squalène présent sur la peau s'oxyde au contact de l'oxygène atmosphérique pour former divers hydroperoxydes comme nous avons pu l'étudier dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Sous l'action des UVs couplés à la température, les insaturations de ce composé réagissent avec l'oxygène moléculaire de l'air pour former des hydroperoxydes.²⁸ Les complexes catalytiques ferreux développés par Unilever sont déjà appliqués en détergence. Leur réactivité vis-à-vis des oxydants nous amène ici à les tester comme activateurs de dégradation des hydroperoxydes de squalène. Il s'agit d'évaluer la pertinence des systèmes SQ(OOH)_n/L_{5N}Fe^{II} sur la formation des COVs présentant une odeur agréable ou comme agent hypoallergénique.

Cette partie du chapitre 4 s'organisera en 4 fractions : suite à la bibliographie des catalyseurs ferreux non hémiques dont certains à base de bispidine (figure 3), l'effet du solvant sera évalué sur la dégradation des hydroperoxydes et l'oxydation des catalyseurs pour les systèmes Fe-MeN₄Py/SQ(OOH)₆ et Fe-bispidone/SQ(OOH)₆. Enfin, les produits formés lors de l'interaction des peroxydes avec les complexes **1** et **2** seront identifiés et quantifiés le tout dans l'objectif d'élucider les mécanismes d'oxydation impliqués dans les systèmes L_{5N}-Fe^{II}/SQ(OOH)_n.



Figure 3 : Structure chimique de la bispidine

IV.1.2. Etat de l'art des complexes ferreux à hauts degrés d'oxydation

IV.1.2.1. Bibliométrie des catalyseurs Fe²⁺ non héminique de type bispidine et N₄Py

La littérature concernant l'oxydation catalysée par les complexes LFe^{II} non héminique est réduite et même totalement absente lorsque la source d'oxygène est un hydroperoxyde. La plupart des études impliquant ces complexes ferreux se focalisent sur les mécanismes d'époxydation de terpènes ; le cyclooctène et le styrène sont les principaux substrats employés, l'oxydant est le peroxyde d'hydrogène et la réaction est réalisée dans l'acétonitrile. Le tableau 1 fait état des résultats obtenus sur Scifinder[®] en fonction des principaux mots clés utilisés.

Mot clé utilisé	« <i>bispidine</i> »	« <i>non heme iron</i> »
Nombre de références	235	2963
Auteur principal	Peter Comba (64 références)	Edward Salomon (134) Lawrence Que (87)
Compagnie – Université	Université d'Heidelberg	Université de Stanford
Première année de publication	1935	1964
Année la plus publiée	2009	2007
Type de documents	183 journaux 32 brevets	2501 journaux 17 brevets
Nombre de références après réduction par mots clés		
+ « catalyst »	58	913
+ « bispidine »	-	1
+ « non heme iron »	1	-

Tableau 1 : Nombre de réponses obtenues sur Scifinder[®] concernant les complexes ferriques non héminique de bispidine.

Comme précisé antérieurement, les catalyseurs étudiés dans ce chapitre sont le Fe-MeN₄Py et le Fe-bispidone, complexe à base de Fe^{II} et d'un ligand pentadenté. La littérature (hors brevet) de ces deux composés est relativement limitée. Leur recherche sur des bases de données tel que Scifinder[®] se révèle complexe car ils peuvent être soit listés soit sous le nom ou le CAS de leur ligand, soit sous le nom ou le CAS des complexes L_{5N}-Fe^{II}. Le tableau 2 présente et résume les données trouvées sur Scifinder[®], pour chacun des composés, lorsque les CAS des complexes sont utilisés.

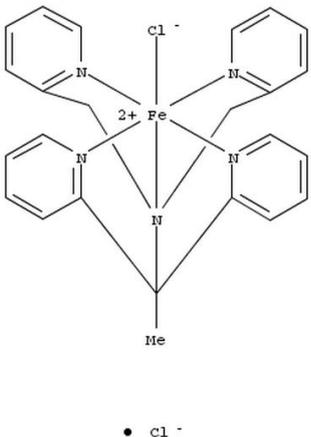
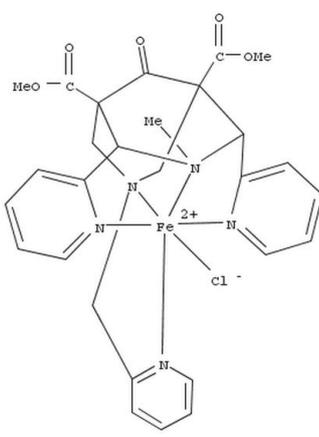
Catalyseur	<i>Fe - MeN₄Py, 1</i> « steel »	<i>Fe - bispidone, 2</i> « stainless »
Formule chimique	C ₂₄ H ₂₃ ClFeN ₅ Cl	C ₂₈ H ₂₉ ClFeN ₅ O ₅ Cl
CAS	328564-06-3	437985-26-7
Formule développée ^{22, 29}		
Type de ligand	MeN ₄ Py Pentadenté	Bispidone Pentadenté
CAS du ligand	223504-10-7	895520-71-5
Nombre de références	28	18
Auteur principal	Ronald HAGE	Ronald HAGE
Compagnie - Université	Unilever	Unilever
Première année de publication	2001	2002
Type de documents	28 brevets	17 brevets 1 publication

Tableau 2 : Résultats obtenus sur Scifinder[®] pour les catalyseurs **1** et **2** en effectuant la recherche à partir du CAS des complexes ferreux.

Cette recherche bibliographique montre clairement la pauvreté de la littérature concernant ces composés. De manière générale, le composé **2** présente tout de même une littérature plus riche que le composé **1** qui ne compte qu'une seule publication avec le ligand (MeN₄Py). Développés et étudiés depuis une dizaine d'années seulement, Fe-MeN₄Py et Fe-bispidone sont avant tout des matières premières industrielles développées par Ronald Hage, Peter Comba et Lawrence Que pour Unilever dans le but d'améliorer les propriétés détachantes des lessives. C'est pourquoi on peut dénombrer 45 brevets. La majorité des publications décrivent leur réactivité sur l'oxydation des oléfines en époxyde et en diols en présence d'H₂O₂, ce qui ne correspond pas à l'application visée ici. C'est pourquoi nos recherches bibliographiques ont été étendues à d'autres complexes ferreux apparentés à ceux utilisés, pour comprendre leurs mécanisme d'action en présence d'H₂O₂ afin de les transposer par la suite aux mécanismes de dégradation des hydroperoxydes.

IV.1.2.2. Influence du ligand sur la réactivité du catalyseur en présence d'oxydant

Les enzymes possédant un atome de fer central non hémérique, catalysent l'activation de l'oxygène pour oxyder hydrocarbures et oléfines. Les capacités uniques du fer à adopter plusieurs états d'oxydation (principalement 2+, d⁶ et 3+, d⁵), à avoir plusieurs potentiels d'oxydo-réduction et différentes configurations électroniques (hauts spins ou bas spins dans les deux premiers états d'oxydation) sont directement liées au ligand auquel il est lié.³⁰ Les propriétés électroniques du complexe, l'activation et la transformation des substrats sont corrélés par le nombre et le type de donneurs, ainsi que leur arrangement géométrique autour du métal central. Les composés coordonnés avec des ligands de type bispidine ont récemment attiré l'attention à cause de la rigidité apportée par le fragment bispidine, et plus particulièrement les complexes tétra- et pentacoordinés.

L'équipe de Que, démontra en 2002 que la réactivité catalytique oxydante d'un complexe ferreux peut être modulée par les propriétés électroniques et stériques du ligand environnant.³¹ En effet, l'étude des structures cristallines a démontré que les dérivés de ligands tétra- et pentadentés ont une sphère de coordination élastique. La limite de l'élasticité résulte de la translation du centre métallique à l'intérieur de la cavité, sachant que le mouvement du métal central est directement influencé par la rigidité du ligand. La cavité rigide et relativement large des ligands de type bispidine explique leur sélectivité élevée vis-à-vis des ions métalliques Fe²⁺ mais également les possibles transferts de charge entre le ligand et le métal central.³² En outre, une modification mineure de la structure des ligands telle que l'ajout de méthyles en position 6 des pyridines (encadré en bleu sur la figure 4), a d'importantes répercussions sur leur réactivité et leur sélectivité.^{31, 33}

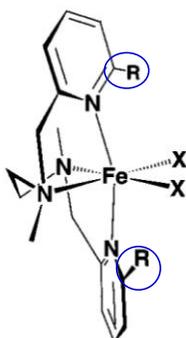


Figure 4 : Définition de la position 6 (encerclée en bleu) sur les pyridines d'un ligand tétradenté N₄ BPMEN (N,N'-diméthyl-N,N'-bis(2-pyridylméthyl)-1,2-diaminoéthane).³¹

Peter Comba et al. ont étudié l'influence de la rigidité des ligands sur l'activité catalytique d'oxydation des oléfines.³⁴ L'augmentation de la rigidité entraîne un accroissement du potentiel redox du couple Fe³⁺/Fe²⁺ du complexe correspondant et probablement aussi du couple Fe⁴⁺/Fe³⁺. Par concomitance, l'activité catalytique semble renforcée. L'interprétation de ces observations réalisées par l'équipe du

professeur Comba suit 3 points : **(a)** les potentiels redox des complexes Fe^{II} sont fortement influencés par les effets stériques et peuvent se trouver renforcés par le squelette du ligand, **(b)** les ligands type bispidine ont des cavités assez grandes et très rigides conduisant à la stabilisation des plus faibles degrés d'oxydation, et ainsi à de potentiels redox relativement élevés, **(c)** un catalyseur actif en oxydation nécessite d'être sous forme oxydée instable et donc d'avoir un haut potentiel redox.

La coordination est également un paramètre très influant. La géométrie des ligands pentadentés implique une pyramide à base carrée ou une géométrie de coordination octaédrique déformée.^{24, 35, 36} Lorsqu'un centre Fe^{II} est rattaché à un ligand tétradenté, le centre ferrique est coordonné à 4 ligands N, avec un arrangement plan des 4 atomes d'azote, tandis que deux sites de coordination restent vacants. Ces deux sites peuvent être occupés soit par une molécule de solvant (connue pour être un ligand labile) ou un anion chlorure Cl^- (moins facilement échangeable).^{35, 37}

La présence de ligand azoté neutre apporte une acidité de Lewis élevée pour l'activation de H_2O_2 par le métal tandis que celle de deux sites labiles est à l'origine de la sélectivité et de l'efficacité catalytique d'un complexe.³⁷ La comparaison des propriétés catalytiques d'une série de complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{LXY}$ (où L est un ligand tétradenté à base d'azote et X et Y des ligands monodentés) indique que la labilité des ligands X et Y (Cl^- ou solvant) détermine la nature de la voie oxydante. L'absence d'un site labile dans le complexe (lorsque $\text{X} = \text{Y} = \text{Cl}^-$) entraîne une réactivité via la réaction de Fenton et la génération exclusive de radicaux hydroxyles. La présence de deux molécules de solvant (ligands labiles - Exemple, $\text{X} = \text{Y} = \text{CH}_3\text{CN}$) permet à la catalyse de procéder selon un mécanisme basé sur le métal, tandis que dans le cas d'un complexe avec uniquement un ligand labile ($\text{X} = \text{Cl}^-$ et $\text{Y} = \text{CH}_3\text{CN}$), la réaction est moins contrôlée par le métal (schéma 1).³⁷ Une étude voltampérométrique a démontré que trois complexes tétradentés ont des potentiels $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ différents dans l'acétonitrile en fonction de la nature de leur ligand monodenté. Cependant, les voltamogrammes cycliques sont réversibles et $\Delta E = 100$ mV lorsque qu'au moins un des sites de coordination vacant est rattaché au solvant, tandis que deux systèmes de vagues sont observés lorsque $\text{X} = \text{Y} = \text{Cl}^-$. La présence des ions chlorures entraîne une diminution des potentiels d'oxydation d'environ 500 mV par anion.

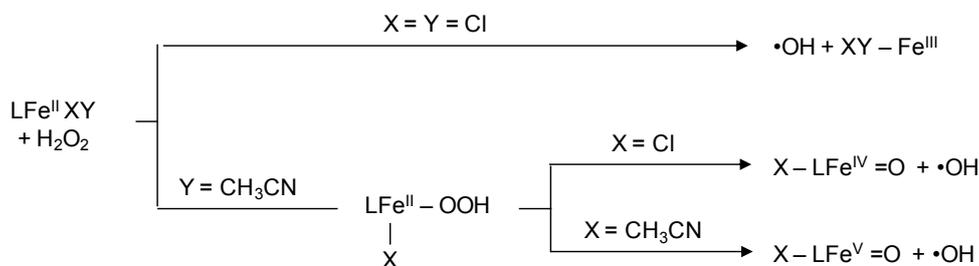


Schéma 1 : Présentation des trois voies réactionnelles pour un système $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{H}_2\text{O}_2$ en présence d'un ligand tétradenté L en fonction des ligands monodentés X et Y.³⁷

Par ailleurs, les complexes de type $LFe^{IV}(O)$ (CH_3CN) ne peuvent oxyder que les substrats avec des énergies de dissociation (BDE) de la liaison C – H inférieures à $80 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Le remplacement du ligand axial CH_3CN par un anion augmente la vitesse de cette réaction.³⁸ Ainsi, certains complexes $LFe^{IV}=O$ ont pu être développés pour attaquer des liaisons C-H fortes comme celles du cyclohexane.³⁸

Que et al. ont également démontré l'importance de la présence de deux sites labiles pour promouvoir le clivage hétérolytique de la liaison O – O de l'intermédiaire $Fe^{III}\text{-OOH}$ (schéma 2).

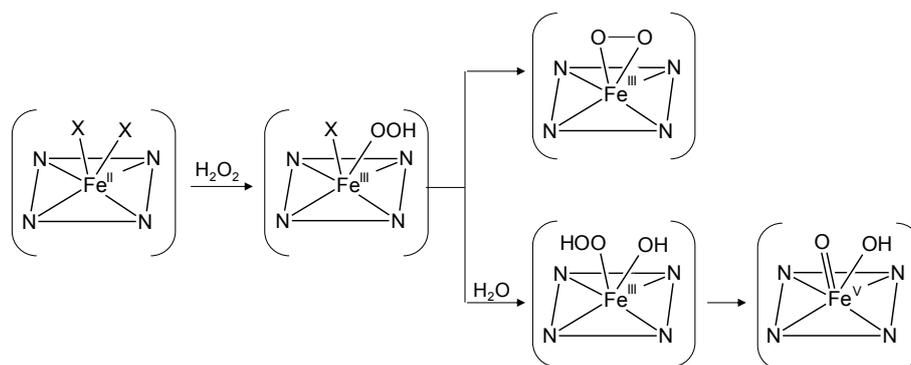


Schéma 2 : Espèces intermédiaires formées lors du clivage hétérolytique de la liaison O-O du complexe oxydé Fe^{II} tétradenté présentant deux sites labiles X, en présence ou non d'eau.^{39, 40}

D'une part, cela permet à l'oxygène terminal des espèces $Fe^{III}\text{-OOH}$ d'interagir avec le fer via une liaison avec le second site labile offrant une force motrice majeure pour le clivage hétérolytique de la liaison O – O.⁴⁰ D'autre part, ils ont montré l'importance d'un second site labile permettant la formation d'une liaison covalente avec H_2O , d'après une étude cinétique et des calculs de DFT,^{39, 41, 42} et ainsi la génération de $Fe^V(O)\text{-OH}$ par $Fe^{III}\text{-OOH}$.

L'étude de l'oxydation du cyclohexane à partir de complexes Fe^{II} – bispidine tétra et pentacoordinés par Comba et al. en 2008 suggère que (i) l'étape déterminant le pourcentage de produits formés (cétone ou alcool) est l'arrachement du proton par le complexe ferreux puisque le radical formé à une faible durée de vie, (ii) en parallèle une autre réaction se produit impliquant HO^{\bullet} (schéma 3), (iii) des différences considérables existent entre les catalyseurs complexés avec un ligand tétradenté ou un ligand pentadenté.⁴³

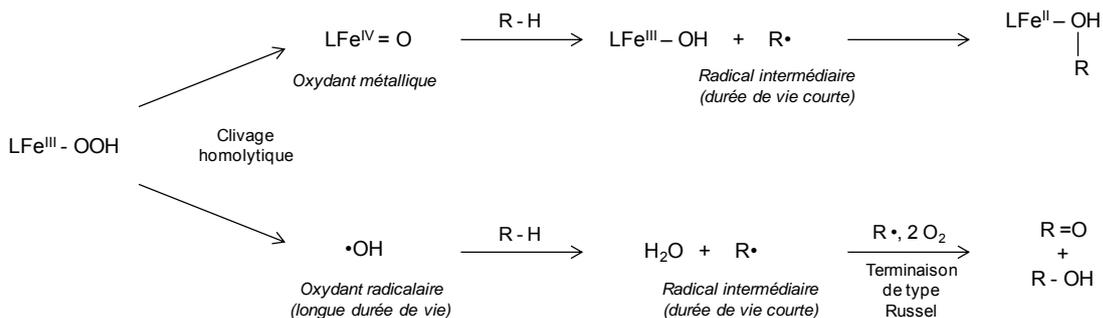


Schéma 3 : Formation de radicaux à longue durée de vie et à courte durée de vie à partir de la forme oxydée Fe(III) d'un complexe à base d'un ligand tétra ou pentadenté.⁴³

Généralement, le mécanisme avancé pour expliquer la catalyse de l'hydroxylation des alcanes est séparé en deux étapes : le clivage de la liaison C-H suivi par la formation de la liaison C-O (équation 4.1).⁴³



Les deux étapes peuvent parfois se produire en même temps : l'atome d'oxygène est inséré dans la liaison C - H ou la liaison C - H est clivée pour former un radical alkyle qui est immédiatement piégé pour former une liaison C - O.

L'oxydation de composés saturés ou insaturés, catalysée par des complexes tétra ou pentacoordinés en présence de peroxyde d'hydrogène, est donc dépendante de la nature du ligand entourant Fe^{II}. Cependant des études menées par Mekmouche et al. en 2004 ont mis en avant que la réaction d'un catalyseur en présence de peroxyde d'hydrogène et d'un substrat peut entraîner la conversion de ligand en chromophore, avec l'insertion d'atome d'oxygène, pouvant entraîner sa décomposition par oxydation.³⁷

IV.1.2.3. Identification des espèces intermédiaires au cours d'un processus d'oxydation d'un complexe Fe^{II}-L

IV.1.2.3.i. Oxydation du complexe Fe^{II} tétracoordiné en présence de peroxyde d'hydrogène et activité catalytique

En présence d'oxydant, tel que le peroxyde d'hydrogène, les complexes L_{4N}-Fe^{II} réagissent pour former des intermédiaires oxydés, à l'origine de l'oxydation des composés saturés et insaturés en époxyde ou en diols. L'étude par DFT couplée à des expériences sur les complexes Fe^{II} à base de ligands de type bispidine tétradentés a permis de mettre en avant différentes voies concernant la formation de l'espèce catalytique à partir du complexe Fe^{II}.¹³ La première conduit à Fe^V = O via un intermédiaire Fe^{III}, tandis que la seconde produit des complexes ferryles Fe^{IV} = O.

En effet, il a été établi que $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ et $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$ sont les intermédiaires formés au cours du processus d'oxygénation catalytique.¹² Bautz et al. ont été les premiers à montrer que dans le cas d'un ligand bispidine tétradenté, les centres Fe^{IV} sont impliqués comme oxydants actifs. Des calculs de DFT ont prédit deux complexes à base de Fe^{IV} : un de spin intermédiaire $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{OH})_2$ et un de spin élevé $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}(\text{OH})$ ce qui n'avait jamais été observé jusqu'à maintenant. Les trois voies réactionnelles suivies par $\text{L}_{4\text{N}}\text{-Fe}^{\text{II}}$ en présence d' H_2O_2 sont détaillées dans le schéma 4.

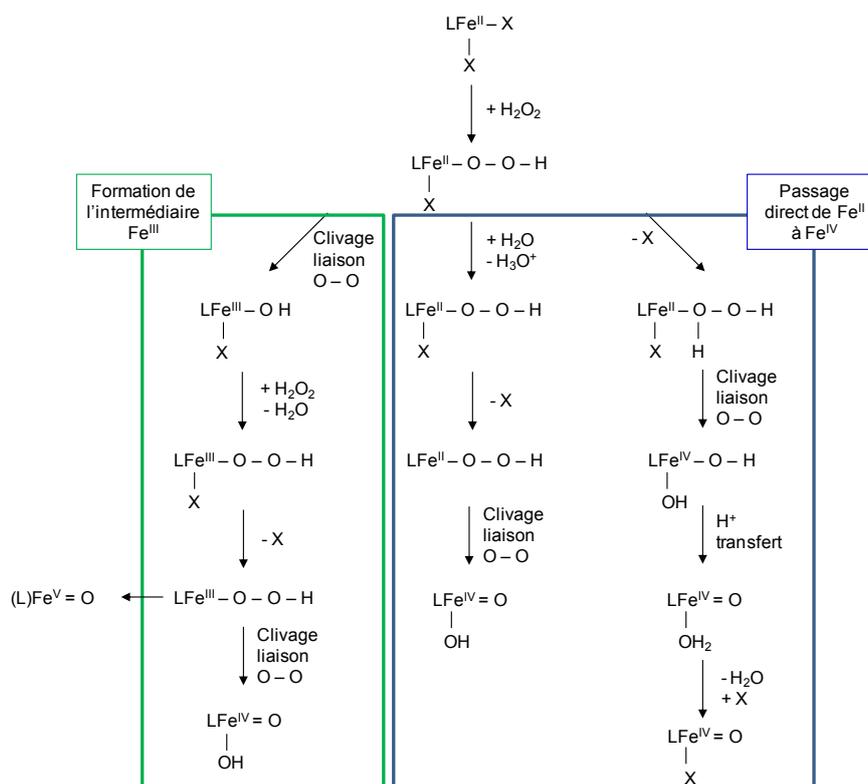


Schéma 4 : Détails des trois chemins réactionnels envisageables lorsqu'un complexe ferreux $\text{Fe}(\text{II})$ tétradenté est mis en présence d' H_2O_2 .^{13, 44}

Thermodynamiquement, les complexes Fe^{IV} sont plus stables que les catalyseurs Fe^{V} (d'environ $50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Cependant, les barrières énergétiques à partir de Fe^{II} sont moins élevées pour Fe^{V} d'approximativement $20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. En se basant sur des calculs théoriques il apparaît que $[(\text{L})\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}(\text{OH})]^+$ et $[(\text{L})\text{Fe}^{\text{V}}\text{=O}(\text{OH})]^{2+}$ sont des catalyseurs efficaces pour l'activation des liaisons C-H et le transfert d'oxygène.⁴³ La réactivité des complexes mononucléaires peroxy- Fe^{III} , hydroperoxy- Fe^{III} et oxo- Fe^{IV} a été évaluée dans des réactions nucléophiles et électrophiles en conditions stœchiométriques. Le complexe peroxy- Fe^{III} est capable de déformyler des aldéhydes via une réaction nucléophile mais pas d'oxygéner des substrats via une réaction électrophile. L'équipe de Nam démontra en 2006 que l'espèce $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ est beaucoup trop lente en tant qu'oxydant et donc que cet intermédiaire ne peut rentrer en compétition avec les complexes à haute valence $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{=O}$, dans les réactions de transfert d'oxygène (OAT).⁴⁵

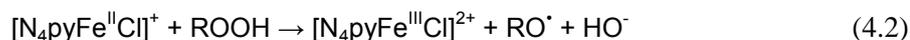
Un autre paramètre important pour l'oxydation de substrat par $L_{4N}\text{-Fe}^{\text{II}}$ est le type d'oxydant interagissant avec le complexe durant l'étape initiale. Ce dernier conduit à la formation de radicaux alkyles à longue durée de vie qui vont diffuser librement dans la solution et en présence de dioxygène, pouvant initier une oxydation radicalaire en chaîne. Les radicaux alkyles formés par des oxydants à base métallique réagissent plus rapidement avec les centres métalliques ($10^{10} \sim 10^{13} \text{ s}^{-1}$).⁴⁶ En effet les mécanismes catalytiques peuvent être initiés selon une voie homolytique ou hétérolytique.⁴⁷ Pour les complexes $[(L)\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OOH})(\text{X})]^{2+}$ dérivés du peroxyde d'hydrogène, la voie hétérolytique conduisant à $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$ est préférée à celle du clivage homolytique de $\text{O}-\text{O}$. A l'opposé, les réactions avec les peroxydes d'alkyle semblent favoriser le clivage homolytique conduisant à $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. Cette différence provient d'une énergie de liaison $\text{O}-\text{O}$ plus élevée de $33,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ dans le cas du peroxyde d'hydrogène.

D'autres facteurs modifient également l'activité catalytique. L'ajout d'acide acétique permet d'accroître à la fois l'activité catalytique et la sélectivité vers l'époxydation selon des observations menées par Jacobsen et al. Il semblerait que la présence d'acide change la nature des espèces actives oxydantes et que la forme active du catalyseur $L_{4N}\text{-Fe}^{\text{IV}}$ forme alors un complexe diFe^{III} .⁴⁸ Fujita et al. proposent que la combinaison de l'acide acétique avec $\text{Fe}(\text{L})$ forme un acide peracétique, activé par la suite pour l'oxydation de l'oléfine par le complexe fer.

IV.1.2.3.ii. Mécanisme d'oxydation d'un système Fe^{II} pentadenté en présence de peroxydes

L'ouverture des sites de coordination est un élément crucial dans les différences de réactivité observées entre les ligands tétradentés et les pentadentés. Les catalyseurs pentadentés Fe -bispidone ou $\text{Fe-N}_4\text{Py}$ ne présentent qu'un seul site de coordination ouvert, contrairement au tétradentés qui en présentent deux.¹³ Les différences de réactivité des complexes $L_{5N}\text{-Fe}^{\text{II}}$ résultent donc dans (i) une oxydation radicalaire des substrats (ii) une sélectivité catalytique de configuration *cis* avec presque 100 % d'efficacité.

Deux types de systèmes pentadentés vont être maintenant discutés plus en détail : $\text{Fe-N}_4\text{Py}$ et Fe -bispidone. Les systèmes $\text{Fe-N}_4\text{Py}$ sont des complexes très réactifs capables d'oxyder une large variété de substrats, incluant les alcanes, les alcènes ou encore les alcools, en présence de peroxyde d'hydrogène. Il y a plus d'un siècle que Fenton reportait que le peroxyde d'hydrogène agit comme un oxydant fort en présence d'ions ferriques. 40 ans plus tard, Haber et Weiss proposèrent la formation du radical hydroxyle (RO^\bullet) dans la réaction de Fenton (équation 4.2).⁴⁹



Le complexe Fe^{II} réagit avec H_2O_2 pour former une espèce intermédiaire $[(\text{N}_4\text{Py})\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}]^{2+}$. Cet intermédiaire se clive homolytiquement, au niveau de la liaison O–O formant deux espèces $[(\text{N}_4\text{Py})\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}]^{2+}$ et HO^\bullet . Le radical HO^\bullet ne permettant pas d'expliquer à lui seul les produits d'oxydation, il en résulte que l'espèce $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ joue également un rôle majeur dans l'oxydation des substrats.²⁰ Bautz et al., dont Peter Comba et Lawrence Que, ont publié en 2006 les preuves semblant conforter l'implication de radicaux hydroxyles dans la chimie de Fenton en milieu aqueux acide.⁵⁰

Ainsi, un système $\text{L}_{5\text{N}}\text{-Fe}^{\text{II}}/\text{H}_2\text{O}_2$ pentadenté produit des complexes $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OOH})$ de faible spin, $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O}_2)$ de haut spin et $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ de spin intermédiaire. L'espèce de bas spin $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OOH})$, bien que très lente, peut être un précurseur, ou s'oxyder en $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ plus réactive.⁵¹ L'analyse par RMN des intermédiaires réactionnels a permis de mettre en avant la formation d'espèces dinucléaires $[\text{LFe}^{\text{III}}-\text{O}-\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}]$, $[\text{LFe}^{\text{III}}-\text{O}-\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}(\text{L})]^{3+}$, de même que $\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{O}-\text{Fe}^{\text{IV}}$.⁵¹ Récemment, l'espèce intermédiaire active $(\text{L}_{5\text{N}})\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})$ a été étudiée par Que, Comba, Costas et al.⁵² La comparaison des données d'une série de complexes a démontré que leurs propriétés spectroscopiques (bande principale à 696-740 nm caractéristique de la liaison $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$)⁵⁰ sont modulées par la nature du ligand pentadenté : plus la liaison Fe-N est longue, plus les effets donneurs de N sont faibles, plus l'énergie nécessaire aux transitions de niveaux sera faible.⁵² De plus, des expériences de voltampérométrie cyclique ont montré que, dans certains cas, la réduction de $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})$ dans l'acétonitrile sec est irréversible. En 2008, Nam et al. ont décrit des observations similaires. La vague de réduction est attribuée à la réduction $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})/\text{Fe}^{\text{III}}(\text{O})$ et son irréversibilité électrochimique trouve son origine dans un transfert d'électron lent.⁵³ Cependant il reste difficile d'étudier la formation de l'espèce $\text{Fe}^{\text{IV}}(\text{O})$ dans un solvant anhydre car aucune source d'atome d'oxygène n'est présente dans le milieu, alors que cela est nécessaire pour stabiliser l'état d'oxydation Fe^{IV} . Nous avons résumé l'oxydation des complexes Fe-Bispidoné et Fe- N_4Py dans le schéma 5 :

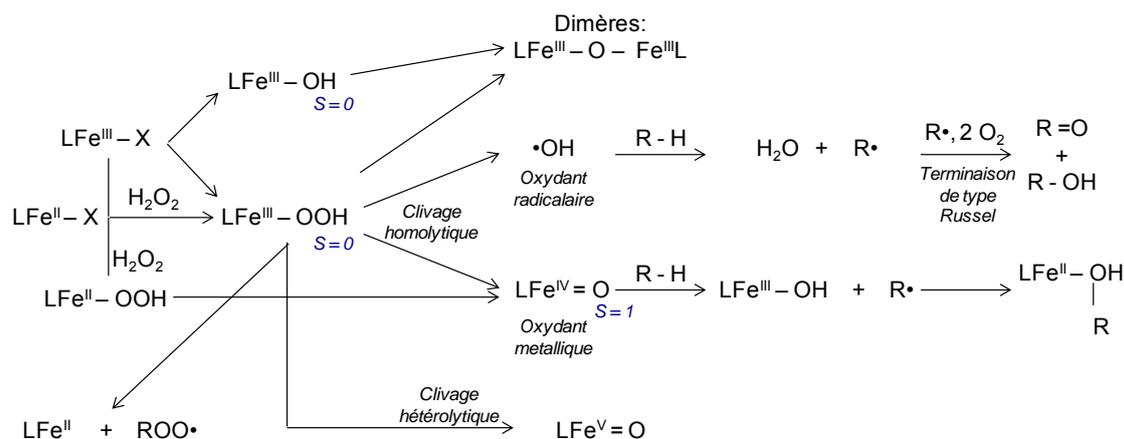


Schéma 5 : Résumé des différentes voies réactionnelles suivies par un complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}$ en présence de peroxyde d'hydrogène.

De même que Nam et al. en 1991 ont testé l'époxydation des oléfines en présence d'autres oxydants que le peroxyde d'hydrogène,⁵⁴ dans le cadre de l'étude des catalyseurs fournis par Unilever, nous allons étudier l'oxydation des complexes Fe^{II} en présence des hydroperoxydes de squalène SQ(OOH)₆ dans différents solvants organiques.

IV.1.3. Présentation des catalyseurs utilisés : Fe-MeN₄Py et Fe-bispidone

IV.1.3.1. FeMeN₄pyCl₂ surnommé le « steel » (1)

Le « steel » ou dichlorure de Fer(II) N,N-Bis(pyridine-2-yl-méthyl)-1,1-bis(pyridine-2-yl)-1-amino-éthane est un composé de couleur rouge orangé de masse moléculaire M = 507,8 g.mol⁻¹ (figure 5 et figure 6).

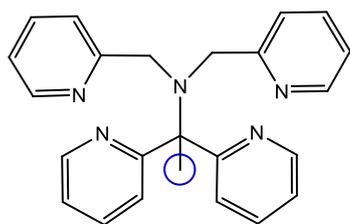


Figure 5 : Structure chimique du ligand MeN₄py du complexe ferreux 1

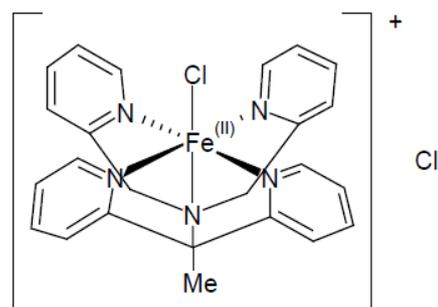
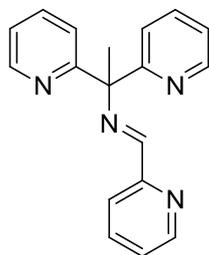
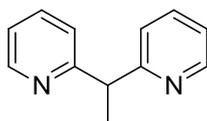


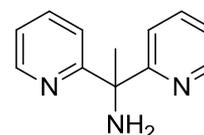
Figure 6 : Structure moléculaire du complexe [MeN₄pyFe^{II}Cl]⁺, Cl⁻

Il est pH dépendant et son action dépend également de la quantité d'oxygène présent dans le milieu. Il est utilisé en détergence pour agir sur les tâches les plus hydrophobes par combinaison avec H₂O₂, l'oxygène dissous ou encore ROOH et RCO₃H.⁵⁵ Ce dérivé du ligand N₄Py montre une haute activité de décoloration des tâches de thé associée à une grande stabilité intrinsèque puisque dans ce cas la position doublement benzylique particulièrement sensible est protégée par un groupement méthyle (encerclé en bleu sur la figure 5). D'après son potentiel redox standard, ce complexe se trouve être un réducteur pour le dioxygène et les hydroperoxydes. La dépendance au pH de Fe-MeN₄Py entraîne la diminution de son potentiel redox standard lorsque le pH augmente favorisant ainsi l'oxydation. Unilever a également démontré que l'oxydation se trouve être accélérée en présence de borate. Les résultats obtenus lors de leurs recherches expliquent cette différence par la liaison de l'espèce tampon (ex. CO₃²⁻) avec le 6^{ème} site de coordination du complexe ce qui change sa stabilité. L'activité du complexe est également dépendante de la concentration en oxygène dans le milieu. Des études suggèrent l'importance du dioxygène dans la formation d'espèces actives lors de la réaction du catalyseur car ce complexe réagit avec O₂ pour former des radicaux superoxydes^{30, 56} et du peroxyde

d'hydrogène. Ces trois oxydants sont responsables de l'oxydation du steel, par des étapes successives de transfert d'électrons. Cependant, sa réactivité en présence d'oxydant entraîne également sa dégradation. En effet, des produits de dégradation du complexe ferreux ont été identifiés et sont représentés ci-dessous (figure 7) :

MeN₃Py-imine

1,1-bis(pyridin-2-yl)-éthane



1,1-bis(pyridin-2-yl)-ethylamine

Figure 7 : Structure chimique des produits de dégradation du complexe $[MeN_4pyFe(II)Cl]^+$ en présence d'oxydants à pH 7.⁵⁷

Par ailleurs, l'activité du « steel » peut être entravée par un certain nombre de facteurs tels que la présence d'impuretés dans le milieu ou de tensio-actifs anioniques qui interagissent avec le complexe ferreux.

IV.1.3.2. Le complexe $Fe(Bispidone)Cl_2$ ou « stainless »

Le « stainless » est un catalyseur à base de Fe^{II} complexé au 2,4-pyridyl-7-[1-(pyridine-2-yl)ethyl]-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane (figure 8). Il est utilisé comme agent de blanchiment par interaction avec l'oxygène atmosphérique.²⁴ Ce composé de couleur jaune se trouve être également dépendant au pH mais aussi à la quantité de dioxygène dissout dans le milieu. Bien qu'il soit utilisé en détergence, il se trouve être influencé par la présence de tensio-actifs. Ce catalyseur permet de retirer les tâches hydrophobes sans peroxyde d'hydrogène mais se trouve être inefficace sur les tâches hydrophiles. Cette différence s'explique par la formation naturelle d'hydroperoxydes le long des chaînes grasses ce qui n'est pas le cas sur les tâches non huileuses.

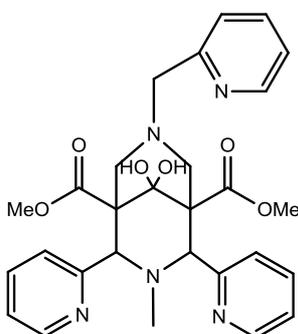


Figure 8 : Structure chimique du ligand L bispidone du complexe catalytique ferrique $[LFeCl]Cl$ sous sa forme diol initiale.⁵⁸

De même que Fe-MeN₄Py ce complexe ferreux peut être oxydé sous sa forme Fe^{III} par un grand nombre d'oxydants tels que l'air, le peroxyde d'hydrogène ou les hydroperoxydes. Ceci est particulièrement vrai à pH élevé à cause de la stabilisation du centre Fe^{III} par les ions hydroxydes.⁵⁹ Ainsi une solution basique n'est-elle pas stable dans le temps et peut donner de nouvelles espèces (figure 9).⁶⁰

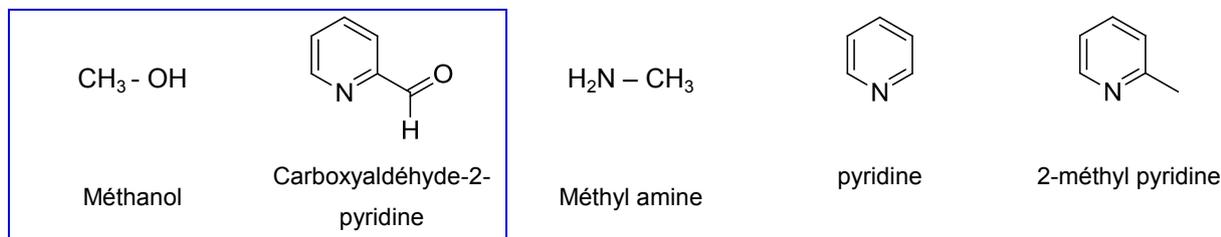


Figure 9 : Produits de dégradation du catalyseur **2** à pH 10. Les produits majoritairement obtenus sont encadrés en bleu.⁶⁰

L'oxydation de ce composé suit une cinétique d'ordre 0 alors que la majorité des complexes ferreux suivent une cinétique de premier ordre. Cette particularité est révélatrice d'une stœchiométrie 1 : 1 entre le catalyseur et l'oxygène.⁶⁰ Cependant cette réaction se révèle être plus complexe que cela puisqu'elle résulte de la formation d'un mono-ester à l'origine de sa dégradation et non de la forme diol initiale du complexe.

De nombreuses recherches ont été effectuées sur la catalyse de réactions chimiques par ce complexe. Le mécanisme avancé repose sur un transfert d'électrons et non pas un transfert d'hydrogène. Lors de l'ajout d'un oxydant dans le milieu, la réaction commence immédiatement par l'oxydation de Fe^{II} en Fe^{III}, sachant que le temps nécessaire pour cette réaction est indépendant de la quantité d'oxydant présent dans le milieu. L'interaction d'un oxydant (tel que les hydroperoxydes) avec le complexe entraîne la scission de la liaison oxygène-oxygène conduisant à un radical organique et à LFe^{III}-OH.

En fonction du type d'oxydant le catalyseur va se retrouver sous sa forme plus ou moins oxydée. La molécule d'oxygène n'est capable d'oxyder Fe^{II} qu'en Fe^{III}. A haut pH la formation de Fe^{III} passe par la formation d'un mono-ester. Cependant son oxydation reste possible sans passer par la formation de l'ester, en présence d'hydroperoxydes, pour atteindre la forme Fe^{IV}, ce qui cause sa décomposition.

La comparaison de Fe-MeN₄py et Fe-bispidone est basée sur leur efficacité pour le blanchiment. Dans ce contexte, le « steel » semble plus performant que le « stainless » car il présente une meilleure stabilité. Le composé **2** se dégrade assez rapidement en présence de peroxyde d'hydrogène tandis que le composé **1** est nettement plus stable. Cette instabilité des catalyseurs ne permet donc pas de les isoler et de les recycler en fin de réaction. De plus la dégradation des complexes ferreux en présence de H₂O₂ impacte le rendement et la robustesse des systèmes catalytiques.

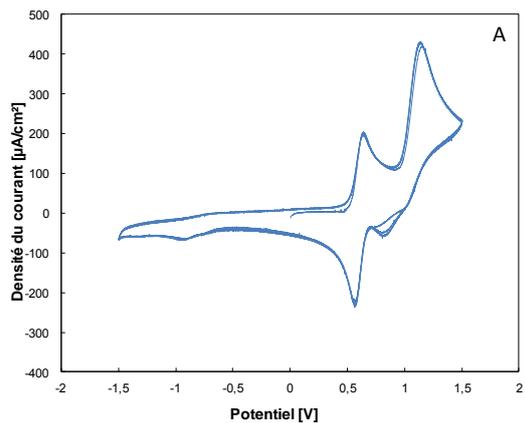
Jusqu'à présent aucune comparaison directe des deux catalyseurs n'a été réalisée que ce soit pour l'époxydation de composés insaturés ou la décomposition de peroxydes, ce sur quoi nous allons focaliser nos recherches dans cette partie.

IV.1.3.3. Comportement des complexes ferreux 1 et 2 dans des solvants organiques : étude par voltampérométrie cyclique.

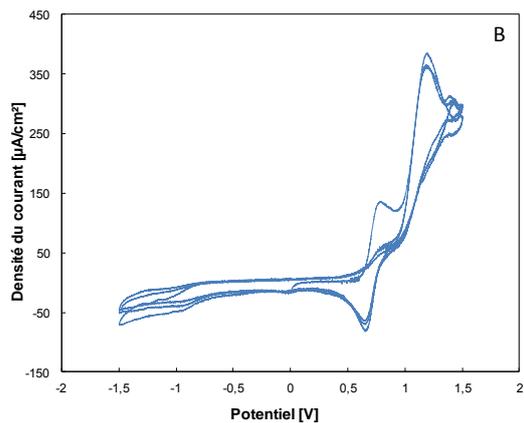
Les dénominations voltammétrie et voltammogramme sont des anglicismes. Les termes français équivalents, que nous avons choisi d'utiliser dans ce manuscrit, sont voltampérométrie et voltampérogramme.

Les catalyseurs ferreux étant développés pour la détergence, ils se trouvent être solubles dans l'eau. Les terpènes et leurs hydroperoxydes étudiés dans le cadre de ces travaux sont solubles dans des solvants organiques et insolubles en milieu aqueux. En catalyse homogène, le substrat et le catalyseur doivent être tous deux solubles dans le solvant utilisé. L'étude des systèmes $L_{5N}-Fe^{II}/SQ(OOH)_6$ nécessite donc de s'assurer en premier lieu de leur solubilité dans l'acétone, l'acétonitrile, le méthanol, le dichlorométhane et le chloroforme. Excepté Fe-bispidone qui présente une solubilité limitée dans l'acétone, les autres systèmes sont parfaitement solubles dans les solvants choisis pour une concentration de $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$.

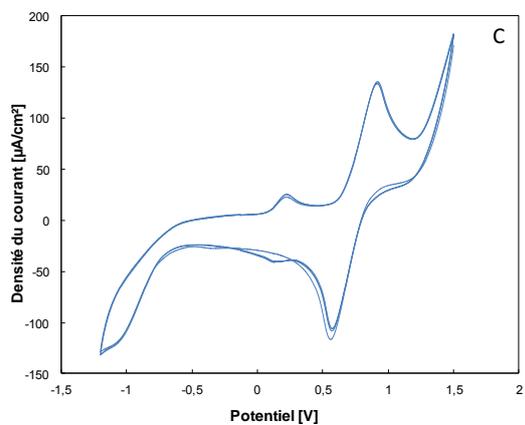
La voltampérométrie cyclique nous a permis de définir le potentiel électrochimique du couples redox des catalyseurs dans les différents solvants. Cette donnée permet d'évaluer l'oxydation de Fe^{II} en Fe^{III} en fonction du solvant organique utilisé mais également de prédire la réactivité du complexe en présence d'oxydant. Dans la littérature, on peut trouver par exemple une valeur de potentiel redox E° du couple Fe^{III} -bispidone / Fe^{II} -bispidone égale à 1V dans l'acétonitrile et celui du couple Fe^{III} - N_4Py / Fe^{II} - N_4Py égale à 1,1 V dans le même solvant.^{34, 61} Cependant, ces données restent très rares voir inexistantes. Pour chacun des catalyseurs et chaque solvant nous les avons donc déterminées expérimentalement. La figure 10 représente les voltampérogrammes cycliques des complexes Fe- MeN_4Py et Fe-bispidone que nous avons réalisés dans les différents solvants.



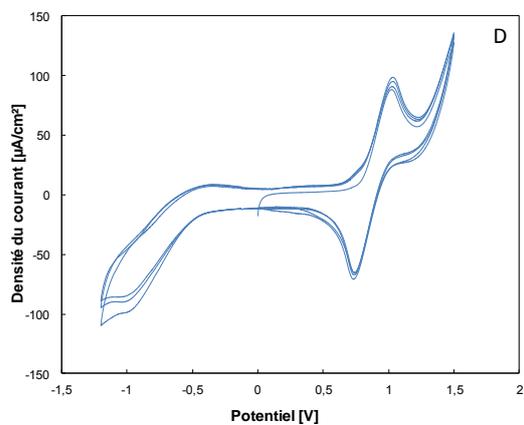
Fe-MeN₄Py dans l'acétonitrile



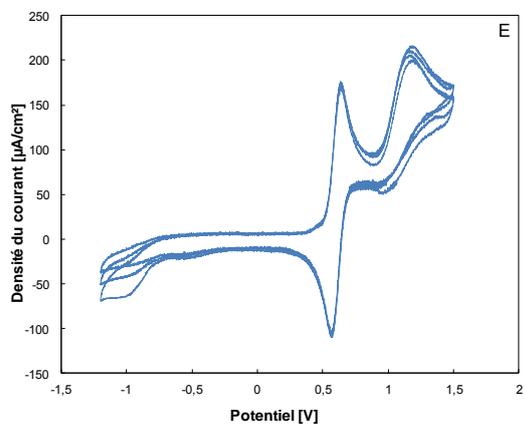
Fe-bispidone dans l'acétonitrile



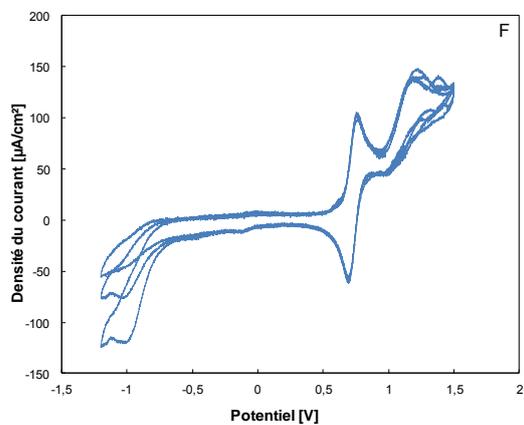
Fe-MeN₄Py dans le chloroforme



Fe-bispidone dans le chloroforme



Fe-MeN₄Py dans l'acétone



Fe-bispidone dans l'acétone

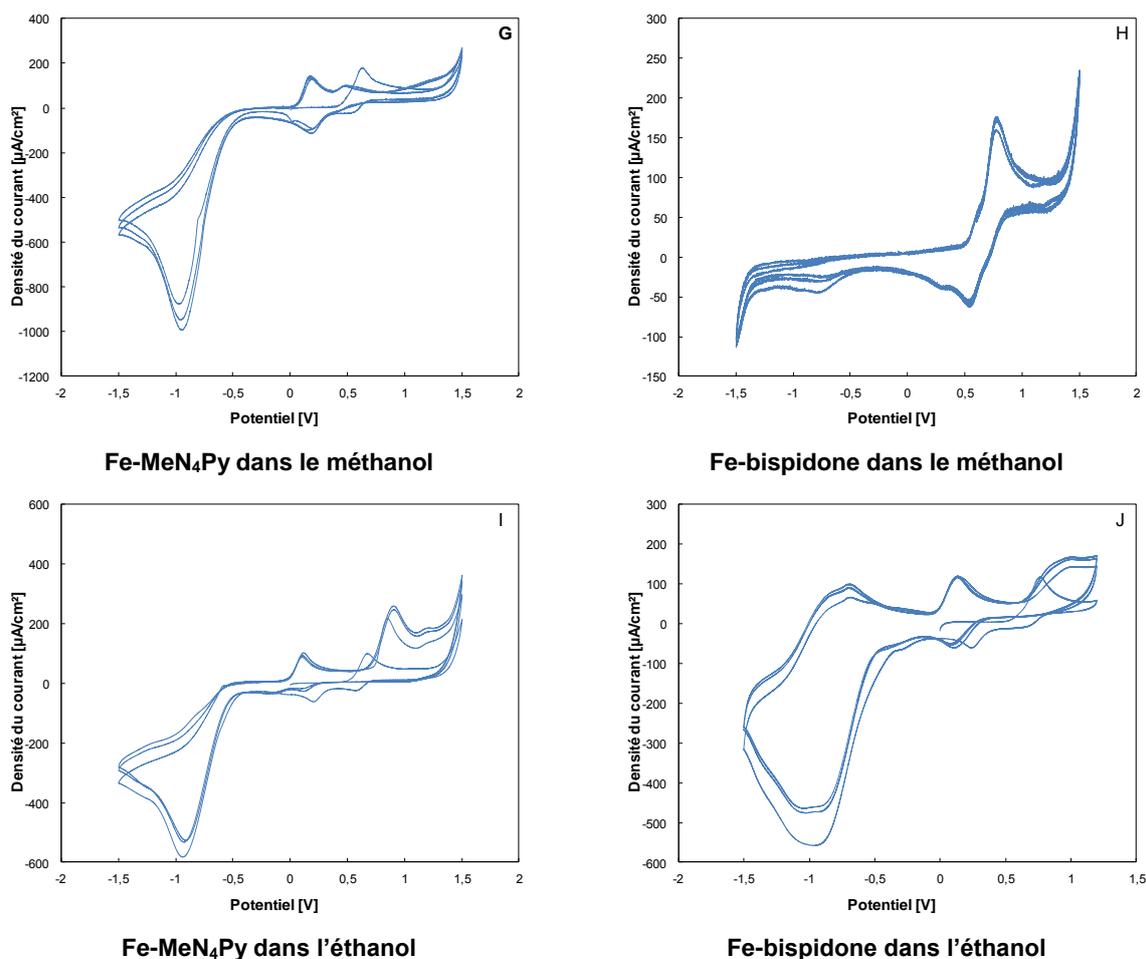
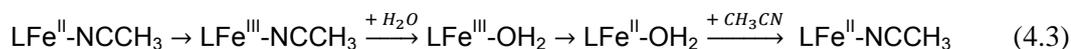


Figure 10 : Voltampérommes cycliques des couples Fe^{3+}/Fe^{2+} des complexes $[Fe-MeN_4Py]$ et $[Fe-bispidone]$: **A)** $[MeFeN_4Py]$ dans l'acétonitrile **B)** $[Fe-Bispidone]$ dans l'acétonitrile **C)** $[MeFeN_4Py]$ dans le chloroforme **D)** $[Fe-Bispidone]$ dans le chloroforme **E)** $[MeFeN_4Py]$ dans l'acétone **F)** $[Fe-Bispidone]$ dans l'acétone **G)** $[MeFeN_4Py]$ dans le méthanol **H)** $[Fe-Bispidone]$ dans le méthanol **I)** $[MeFeN_4Py]$ dans l'éthanol **J)** $[Fe-Bispidone]$ dans l'éthanol (Conditions : 0,1M TBATFB ; 100 $mV \cdot s^{-1}$; 25°C – électrode de référence : ECS ; électrode de travail : carbone vitreux ; électrode auxiliaire : Pt).

Dans le cas du complexe $Fe^{II}-MeN_4Py$, nous pouvons observer deux vagues d'oxydation réversibles à 0,4 V et 1,1 V dans l'acétonitrile, correspondant respectivement à l'oxydation de $LFe^{II}-OH_2 \rightarrow LFe^{III}-OH_2$ et $LFe^{II}-NCCH_3 \rightarrow LFe^{III}-NCCH_3$.⁶¹ En effet, Draksharapu et al. ont démontré en 2012, que l'ajout d'1% d'eau dans une solution d'acétonitrile suffisait à commuter CH_3CN par H_2O et à obtenir ce tracé. Dans notre cas, bien que l'on ait pris les précautions nécessaires pour minimiser cet apport, il est possible que de traces d'eau résident dans le solvant de gradient CLHP, expliquant ainsi les résultats obtenus. Dans le chloroforme, le voltampéromme **C** montre une oxydation réversible de $Fe^{II}-MeN_4Py$ à 0,9 V. L'irréversibilité des voltampérommes cycliques dans le méthanol et l'éthanol peut s'expliquer par la formation de l'espèce $Fe^{IV}=O$, dont le ligand est instable, par oxydation de LFe^{III} .⁶² En effet, l'emploi d'un solvant donneur de proton, porteur d'oxygène, permet la formation de l'oxo-ferryle ce qui peut expliquer l'irréversibilité du tracé.⁶³ De plus, dans ces solvants alcooliques, un effet de *coating* autour de l'électrode de travail, provenant du catalyseur, a été observé, pouvant altérer partiellement le signal.

Par ailleurs, Fe^{II}-bipidone s'oxyde de manière réversible à 1 V dans le chloroforme et à 0,7 V dans l'éthanol. Nous pouvons également souligner que l'oxydation du complexe **2** dans l'acétonitrile semble marquée par la présence d'eau (équation 4.3) telle que :



Aussi, les complexes **1** et **2**, dévoilent, dans l'acétone, les voltampérogrammes cycliques **E** et **F**, réversibles, et marqués par la présence d'un composé donneur de proton. Ainsi, Fe-MeN₄Py montre une oxydation réversible à 0,6 V et irréversible à 1,2 V, de même pour Fe-bispidone à 0,8V et 1,2V.

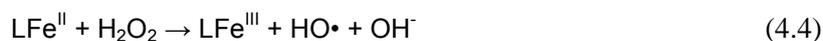
Le tableau 3 regroupe les valeurs de E° et de ΔE inter pics obtenues à partir des volampérogrammes cycliques. Le ΔE correspond à l'écart au sommet des deux pics d'oxydation et de réduction des couples redox mis en jeu.⁶⁴

Solvant	Moment dipolaire D ⁶⁵	[MeN ₄ PyFe(II)Cl]Cl		[BispidoneFe(II)Cl]Cl	
		ΔE (V)	E° (Fe ^{III/II}) (V)*	ΔE (V)	E° (Fe ^{III/II}) (V)*
Acétone	2,88	0,049	0,84	0,058	0,97
Acétonitrile	3,92	0,043	0,831	0,522	1,17
Chloroforme	1,04	0,338	0,97	0,253	1,11
Ethanol	1,69	irréversible		irréversible	
Méthanol	1,70	irréversible		0,267	0,85

* Les valeurs sont données par rapport à l'électrode normale à hydrogène.

Tableau 3 : Différence de potentiel ΔE inter pics et potentiel redox du couple Fe^{3+/2+} pour chaque complexe ferreux calculés d'après les voltamogrammes cycliques dans chaque solvant organique. (Conditions : 35 mL de solvants à 0.1 M de TBATFB ; 100 mV.s⁻¹ ; 25 C).

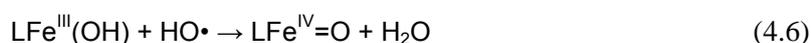
Le transfert d'électrons dépend d'un certain nombre de facteurs tel que la nature du solvant, la nature du réactif, l'état d'énergie de l'électron ou encore la température.⁶⁶ D'après le mécanisme classique de Haber-Weiss/Fenton la vitesse d'oxydation du complexe avec le peroxyde d'hydrogène semble pouvoir être corrélée avec le potentiel redox du complexe.⁶⁷



Le produit du transfert d'électron, [Fe^{III}(O)(L)]⁺ a une basicité élevée et se protone immédiatement au cours des réactions d'oxydation des substrats organiques. Cette protonation conduit à la formation d'un complexe plus stable thermodynamiquement [Fe^{III}(OH)(L)]²⁺ et va conduire à une valeur plus élevée de E_{red}.³²

La nature du solvant gouverne également la réactivité des complexes **1** et **2**. En effet, il peut se substituer à l'anion chlorure et devenir co-ligand monodenté du complexe en question. Or, les différences de potentiels reflètent les différences de forces de liaison avec les co-ligands.²⁴ La basicité

du ligand axial influence directement le potentiel électrochimique des couples redox. Ainsi, le mécanisme suivant peut être considéré dans l'eau pour les systèmes à base de bispidone, notant que $\text{LFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ et $\text{LFe}^{\text{III}}-\text{O}^\bullet$ ont des représentations électroniques équivalentes.^{68, 69}



La capacité de HO^\bullet à arracher un hydrogène à $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH})$ a été démontrée par Melton et al. en 1990.⁷⁰ Une conséquence de ce mécanisme est que les radicaux hydroxyles formés durant le processus de type 'Fenton' ne sont pas libérés du complexe pour permettre le processus d'oxydation. En présence d'un ligand organique, l'arrachement d'un atome d'hydrogène peut entraîner la modification de la structure du ligand et sa dégradation.^{71, 72} De plus, Peter Comba et al. ont démontré que l'augmentation de la rigidité du ligand entraîne un accroissement du potentiel redox du complexe correspondant au couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, ce qui est le cas du complexe **2**. En effet, la comparaison des potentiels électrochimiques révèle que le couple redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ du complexe Fe-bispidone présente des valeurs de E° plus élevées. Par concomitance, l'activité catalytique semble alors également augmentée car un catalyseur actif en oxydation nécessite un haut potentiel redox, qui est une forme oxydée instable du catalyseur.³⁴ Par ailleurs, Des études réalisées chez Unilever, révèlent un lien étroit entre l'augmentation de la réactivité d'un complexe avec le peroxyde d'hydrogène et la diminution du potentiel redox du couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$. Ainsi la réactivité du complexe Fe-MeN₄Py dans les solvants organiques évolue de la manière suivante acétonitrile>acétone>chloroforme et celle du complexe Fe-bispidone évolue dans l'ordre suivant méthanol > acétone > chloroforme > acétonitrile.

En résumé, la comparaison des deux complexes dans les différents solvants montre des potentiels redox plus élevés dans le cas du complexe Fe-bispidone, ce qui est en accord avec une rigidité plus importante du ligand par rapport à Fe-MeN₄Py. En ce qui concerne leur réactivité en présence de peroxydes, plus le potentiel redox d'un couple est faible, plus celui-ci est réactif. Ainsi les résultats obtenus semblent présager que la meilleure réactivité pour le complexe Fe-MeN₄Py sera obtenue dans l'acétonitrile tandis que celle de Fe-bispidone sera dans le méthanol.

*IV.1.3.4. Détermination des coefficients d'extinction molaire de **1** et **2** et vérification de la loi de Beer-Lambert*

L'étude de l'oxydation des catalyseurs en présence d'hydroperoxydes est facilitée par l'absorbance des complexes ferreux à certaines longueurs d'ondes spécifiques selon leur structure. Ainsi le complexe ferreux **1** sous sa forme Fe^{II} absorbe à 489 nm. Le second catalyseur quand à lui absorbe autour des 300 nm. Afin de sortir de la zone de saturation de l'absorbance, nous suivrons son oxydation à 385 nm.

La loi de Beer–Lambert relie la concentration en espèce colorée à l’absorbance (équation 4.7):

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C \quad (4.7)$$

- A_{λ} : l’absorbance à la longueur d’onde λ
- ε_{λ} : le coefficient d’extinction molaire en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
- l : la longueur de la cuve en cm (ici la cuve fait 1 cm)
- C : la concentration de la solution analysée en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Cette loi est utilisée pour de nombreux dosages d’espèces chimiques colorées mais elle a des limites. Elle n’est valable que pour de faibles concentrations et des absorbances inférieures à 2. Le domaine de validité de cette loi sera vérifié préalablement par une évolution linéaire de l’absorbance en fonction de la concentration en catalyseur. Pour un composé chimique donnée à une longueur d’onde fixée, A vaut kC où k est une constante égale au coefficient d’extinction molaire ε multiplié par la longueur de la cuve, ici 1 cm (figure 11).

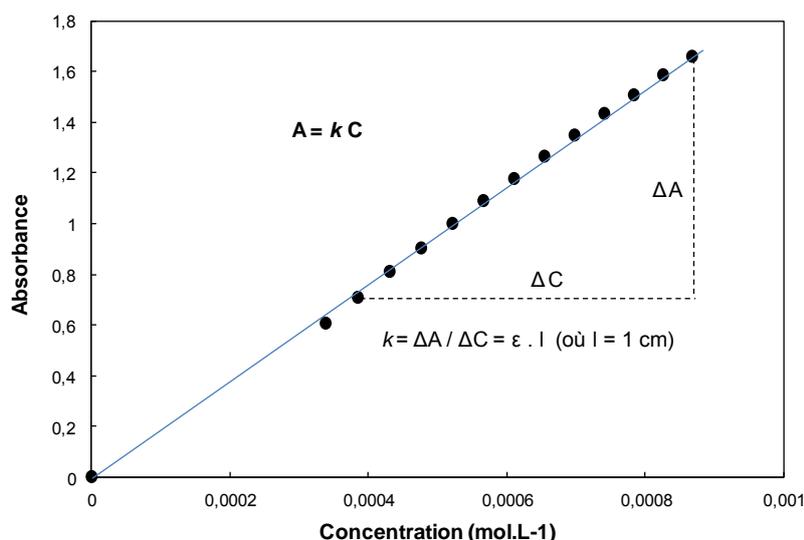


Figure 11 : Représentation graphique de l’évolution de l’absorbance à 385 nm du complexe Fe-bispidone en fonction de sa concentration. Ce graphique a été réalisé pour vérifier la loi de Beer-Lambert pour le complexe ferrique **2** dans l’acétonitrile.

Dans 2 mL de solvant, des portions de 10 μL de solution à 0,01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de catalyseur, ont été successivement ajoutées et l’absorbance a été enregistrée par le spectromètre UV après 30 secondes. L’analyse a été réalisée sous agitation et à 20°C. Les données sont enregistrées à une longueur d’onde de 489 nm dans le cas du catalyseur **1** et 385 nm dans le cas du complexe ferrique **2**.

La loi de Beer-Lambert a été vérifiée pour les deux complexes $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-L}_{5\text{N}}$, dans l’acétone, l’acétonitrile, le chloroforme, l’éthanol et le méthanol entre $2\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, exception faite pour le complexe **2** dans l’acétone, à cause de sa mauvaise dissolution gênant les mesures d’absorbance par le

spectromètre UV. Nous avons ainsi déterminés expérimentalement les coefficients d'extinction molaires, grâce à la loi de Beer-Lambert, par la représentation graphique de $A = f(C)$: ϵ correspond à la pente de la droite étant donné que la longueur de la cuve vaut 1 cm (figure 11). Le tableau 4 regroupe l'ensemble des données obtenues.

Solvant	Moment dipolaire D^{65}	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	
		Complexe 1 $\lambda = 489$ nm	Complexe 2 $\lambda = 385$ nm
Acétone	2,88	3755,2	/
Acétonitrile	3,92	4718,3	1903,5
Chloroforme	1,04	6440,7	2418,7
Ethanol	1,69	4487,8	2059,6
Méthanol	1,70	3576,4	1711,5

Tableau 4 : Coefficient d'extinction molaire ϵ (L.mol⁻¹.cm⁻¹) des complexes ferriques 1 et 2 pour cinq solvants organiques de polarité différente.

Le coefficient d'extinction molaire est dépendant de la longueur d'onde, de la température, de la nature du soluté et du solvant. Pour chaque catalyseur seule la nature du solvant change ; le coefficient d'extinction molaire le plus élevé est obtenu dans le solvant le moins polaire, le chloroforme, et le moins élevé est obtenu dans le méthanol. Bien que les moments dipolaires de l'éthanol et du méthanol soient quasiment similaires, il n'en est pas de même pour leurs valeurs de ϵ . Cela signifie que le caractère δ^+ de l'atome d'hydrogène de CH₃-OH prime sur celui de l'éthanol, solvatant préférentiellement l'état fondamental du complexe en modifiant la probabilité de transition électronique. Dans l'acétonitrile et l'éthanol, Fe-MeN₄Py et Fe-bispidone ont des absorptivités similaires bien que leur polarité soit du simple à plus du double. Que ce soient pour le complexe 1 ou le complexe 2, les tendances des valeurs d' ϵ semblent évoluer dans le sens CHCl₃ < acétonitrile-éthanol < méthanol. Ces premières constatations soulignent que les valeurs de ϵ ne sont pas uniquement liées à la polarité du solvant. D'après la littérature,^{37, 51} cette différence peut s'expliquer par la complexation du solvant avec le sixième site de coordination du métal central, remplaçant l'anion, et modifiant ainsi les transferts de charges entre le ligand et Fe^{II} et donc les valeurs d' ϵ . En effet, le coefficient d'extinction molaire plus élevée dans le chloroforme, semble indiquer une transition électronique favorisant les transferts d'électrons entre le ligand et le centre métallique.

IV.1.4. Etude du système Fe^{II} -MeN₄Py / SQ(OOH)₆

IV.1.4.1. Détermination du ratio substrat/catalyseur

La littérature concernant les systèmes hydroperoxydes de squalène/ $L_{5N}Fe^{II}$ est inexistante, que ce soit en termes de publication ou de brevets. Par ailleurs, les rapports d'études de Fe-MeN₄Py et Fe-bispidone d'Unilever ne nous apportent pas les données nécessaires à leur utilisation dans le cadre de nos recherches. Utilisés dans la détergence, ils se trouvent être principalement étudiés en milieu aqueux et basique en présence d'oxydants tels que le dioxygène et le peroxyde d'hydrogène.

Le ratio catalyseur/SQ(OOH)₆ dans le cadre de cette étude doit permettre le suivi de la réaction dans le temps. La conversion des peroxydes ne doit pas être trop rapide afin d'obtenir au moins 3 points en début de réaction tout en conservant un rendement efficace. Généralement les conditions catalytiques sont [complexe] = 10-20 μ M pour [H₂O₂] = 1-10 mM soit un ratio catalyseur/H₂O₂ de 1/100. Trois essais ont été effectués à des ratios $L_{5N}Fe^{II}$ /SQ(OOH)₆ de 1/100, 5/100 et 10/100 afin de définir les meilleures conditions expérimentales. Pour chacun d'entre eux, la vitesse initiale a été définie. Celle-ci caractérise la cinétique d'interaction entre les peroxydes et les catalyseurs et donc l'amorce de la réaction d'oxydation. Cette donnée correspond au ratio d(C) sur d(t), où C est la conversion en produit formé et t le temps, entre 0 et 30 minutes de réaction. Cette expérience préliminaire a été réalisée pour le système Fe-MeN₄Py/SQ(OOH)₆ dans le chloroforme et sera considérée valable pour l'ensemble de l'étude (figure 12).

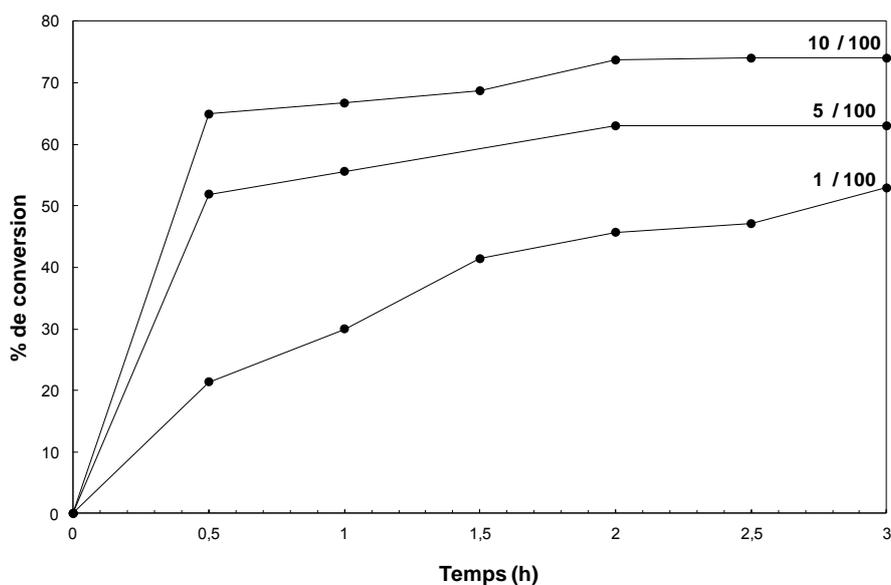


Figure 12 : Suivi par titration indirecte à l'iode de la conversion des hydroperoxydes ($n = 6$) de squalène en présence de catalyseur 1 en fonction du temps pour différents ratios catalyseur / substrat. (solvant : chloroforme - SQ(OOH)₆ préparés par oxydation chimique H₂O₂/Na₂MoO₄/MeOH)

Le ratio 1/100 a une vitesse initiale de $0,4 \text{ h}^{-1}$ et une progression constante au cours du temps. Au bout de 3 heures, aucun palier n'est atteint et le pourcentage de conversion est de 52 %. Lorsque l'on introduit 5 équivalents du complexe **1** pour 100 équivalents de $\text{SQ}(\text{OOH})_6$, la vitesse initiale est de $1,0 \text{ h}^{-1}$ et un palier à 63 % de conversion de $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ est atteint au bout de 2 heures. Enfin le système catalytique 10/100 a une vitesse initiale à $1,3 \text{ h}^{-1}$ et 74% de conversion des motifs $-\text{OOH}$ sont atteints après 2 heures de réaction.

Pour rester proche des conditions catalytiques utilisées tout en optimisant les résultats obtenus, nous avons choisi de suivre, dans la suite de ce chapitre, la dégradation des hydroperoxydes de squalène en présence des complexes ferreux dans un ratio catalyseur/substrat de 5 pour 100. La réactivité des complexes $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{II}}$ avec H_2O_2 respecte des conditions stœchiométriques 1 :1. Dans cette étude, nous utilisons des hydroperoxydes de squalène peroxydés 6 fois. L'ajout de 100 équivalents de $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ apporte donc 600 motifs $-\text{OOH}$ transposant alors le ratio catalyseur/oxydant à 5/600 soit environ 1/100. En utilisant ce ratio nous sommes ainsi cohérents avec les conditions « standard » d'utilisation des complexes ferreux en détergence. Par ailleurs, il a été reporté antérieurement qu'un des intermédiaire réactionnel issu de l'oxydation de LFe^{II} en présence d'hydroperoxydes est $\text{LFe}^{\text{III}}-\text{OOH}$. Le choix d'un ratio complexe/ $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ égale à 5/100 permet de considérer la formation de l'hydroperoxo-ferrique comme négligeable lors du suivi de la réaction par dosage indirecte à l'iode des groupements $-\text{OOH}$ présents dans le milieu.

IV.1.4.2. Dosage des peroxydes au cours du temps en présence de $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{MeN}_4\text{Py}$

La première étape de l'étude du système $\text{Fe}-\text{MeN}_4\text{Py}/\text{SQ}(\text{OOH})_6$ consiste au suivi et à la quantification des motifs peroxydes présents dans le milieu au cours du temps de réaction. Pour cela la titration indirecte à l'iode a été choisie étant donné que les solutions contenant les catalyseurs sont colorées rendant leur suivi par HPLC difficile et que la présence d'un métal ferromagnétique ne permet pas leur analyse par RMN. De plus, cette méthode, réalisée selon la norme AFNOR NFT 60-220, se révèle être rapide et reproductible. La représentation du pourcentage de conversion des hydroperoxydes en produits de dégradation en fonction du temps, figure 13, révèle de grandes différences d'évolution en fonction du solvant utilisé.

Deux tendances majeures ressortent de la comparaison des courbes. La première regroupe les deux solvants avec les moments dipolaires les plus extrêmes, l'acétonitrile ($D = 3,92$) et le chloroforme ($D = 1,04$). La conversion des peroxydes est rapide au cours des trente premières minutes (vitesse initiale d'environ 1 h^{-1}), avant de légèrement ralentir et d'atteindre un palier après 2 heures de réaction. Après six heures, le système dans l'acétonitrile présente le plus haut taux de conversion avec 72,5%.

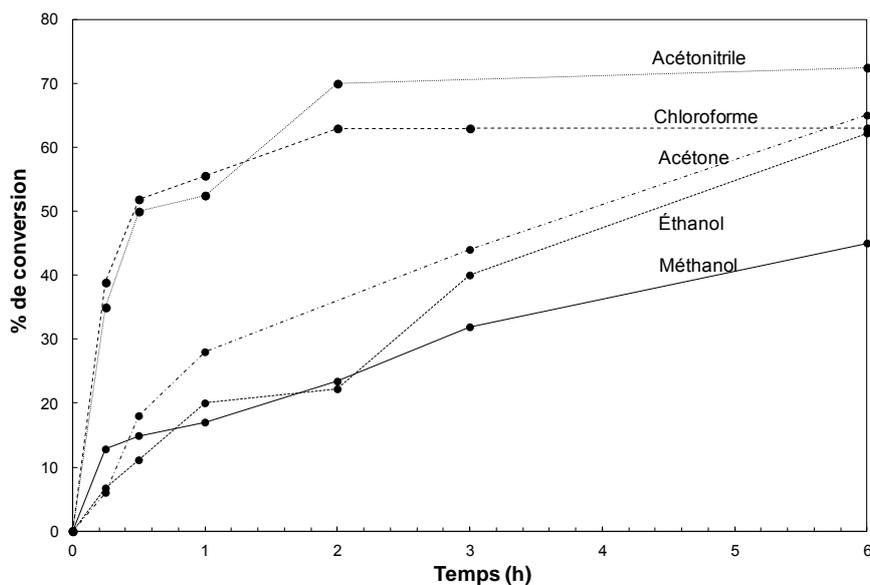


Figure 13 : Suivi par titration indirecte à l'iode de la conversion des hydroperoxydes de squalène $SQ(OOH)_6$ en présence du catalyseur 1 dans différents solvants organiques. (Conditions : catalyseur 1/hydroperoxydes de squalène – 5/100).

Le méthanol, l'éthanol et l'acétone forment le second groupe. Dans ce dernier, la dégradation des hydroperoxydes s'effectue de manière progressive, et aucun palier n'est observé. La vitesse initiale moyenne est d'environ $0,3 \text{ h}^{-1}$ (tableau 5). Avec 45 % de conversion au bout des 6 heures, le méthanol présente le plus faible taux de conversion bien qu'il présente un moment dipolaire égale à $D = 1,70$. Les systèmes dans l'acétone et l'éthanol ont des taux de conversion similaires de respectivement 64 % et 62,2 % pour des moments dipolaires respectifs de 2,88 et 1,69.

Solvant	Moment dipolaire D^{65}	$E^{\circ}_{Fe(III)/Fe(II)}$ (V)	Vitesse initiale (h^{-1})	% de conversion à 6h	Temps nécessaire pour atteindre le palier
Acétone	2,88	0.84	0,3	64	> 6h
Acétonitrile	3,92	0.831	1	72,5	2h
Chloroforme	1,04	0.97	1,04	63	2h
Ethanol	1,69	/	0,22	62,2	> 6h
Méthanol	1,70	/	0,36	36	> 6h

Tableau 5 : Résumé de la vitesse initiale (en h^{-1}) de conversion, du pourcentage de conversion après 6 heures, de la durée nécessaire pour l'obtention d'un palier pour les systèmes $[MeN_4PyFe(II)Cl]Cl / SQ(OOH)_6$ en fonction des solvants employés et de leur moment dipolaire.

Ces premiers résultats démontrent que la polarité du solvant n'est pas un facteur influent de l'activité du système catalyseur/ $SQ(OOH)_6$. Pour l'activité catalytique de Fe- MeN_4Py , la présence d'atome d'oxygène dans la structure chimique du solvant semble avoir plus d'importance sur la conversion des hydroperoxydes que leur polarité à proprement parler. Le mécanisme de réaction du complexe

[MeN₄pyFe(II)Cl]Cl avec les peroxydes est basé sur la formation d'espèce intermédiaires Fe^{III} – OOR, Fe^{III} – OH et Fe^{IV}=O. Une hypothèse susceptible d'expliquer la différence de tendance observée entre les deux groupes de solvants repose sur la formation d'un complexe stable LFe – solvant sur le sixième site de coordination laissé vacant par l'anion en solution, par les solvants porteur d'un atome d'oxygène. Dans ce cas, le solvant devient co-ligand monodenté et peut stabiliser le complexe catalytique l'empêchant de s'oxyder par réaction avec les hydroperoxydes. Ainsi la cinétique est plus lente et progressive puisque l'oxydation se produit après substitution du co-ligand par les peroxydes et non par interaction directe.³ Afin de conforter cette hypothèse de stabilisation du complexe dans l'acétone, le méthanol et l'éthanol, nous avons suivi l'oxydation du complexe par spectrométrie UV. Si elle se révèle correcte, le catalyseur devrait s'oxyder en suivant la même cinétique que la conversion des peroxydes.

IV.1.4.3. Suivi par spectrométrie UV de l'oxydation du complexe Fe^{II}-MeN₄Py en présence des hydroperoxydes de squalène

Le complexe Fe^{II}-MeN₄Py est de couleur orange en solution. Son oxydation entraîne une diminution de l'absorbance à la longueur d'onde de 489 nm.

IV.1.4.3.i. Protocole experimental

Les solutions sont préparées en introduisant 8 mg de peroxydes isolés (réalisés par oxydation chimique, M = 602 g.mol⁻¹) dans 2 mL de solvant, et ce pour l'acétone, l'acétonitrile, le chloroforme, l'éthanol et le méthanol, afin d'obtenir une solution à 0,007 mol.L⁻¹ de SQ(OOH)₆. La solution de peroxydes est ensuite introduite dans la cuve UV, sous agitation et thermo régulation à 20 °C. Le « zéro » est réalisé sur ce mélange. Puis, 60 µL de solution contenant 0,01 mol.L⁻¹ de catalyseur, réalisé dans le solvant correspondant, sont ajoutés dans la cuve UV et l'enregistrement de l'absorbance est démarré. L'évolution de la quantité du complexe Fe^{II}MeN₄Py est suivie à 489 nm. Les expériences ont été réalisées sur 3 heures ; le dosage des peroxydes ayant établi qu'après cette durée l'évolution du système catalyseur/péroxydes est faible voir nulle. La reproductibilité est estimée à 10 %.

IV.1.4.3.ii. Oxydation du complexe Fe^{II}-MeN₄Py par les SQ(OOH)₆

Des expériences réalisées au sein des laboratoires de R&D d'Unilever, à Portsunlight, ont démontré que les complexes ferreux réagissent en présence d'oxydant tels que O₂, H₂O₂ ou les peroxydes pour s'oxyder, voir se dégrader. Le suivi, par dosage, des peroxydes dans le milieu au cours du temps a confirmé la réactivité des catalyseurs en présence des hydroperoxydes de squalène avec une influence marquée de la nature du solvant. Théoriquement, si une réaction se produit entre le complexe L_{5N}Fe^{II} et les peroxydes, l'atome de fer central doit s'oxyder en L_{5N}Fe^{III} et présenter des spectres UV

différents. Afin de le démontrer, nous avons enregistré le spectre du complexe à l'état fondamental et après 3h au contact de SQ(OOH)₆ (figure 14) :

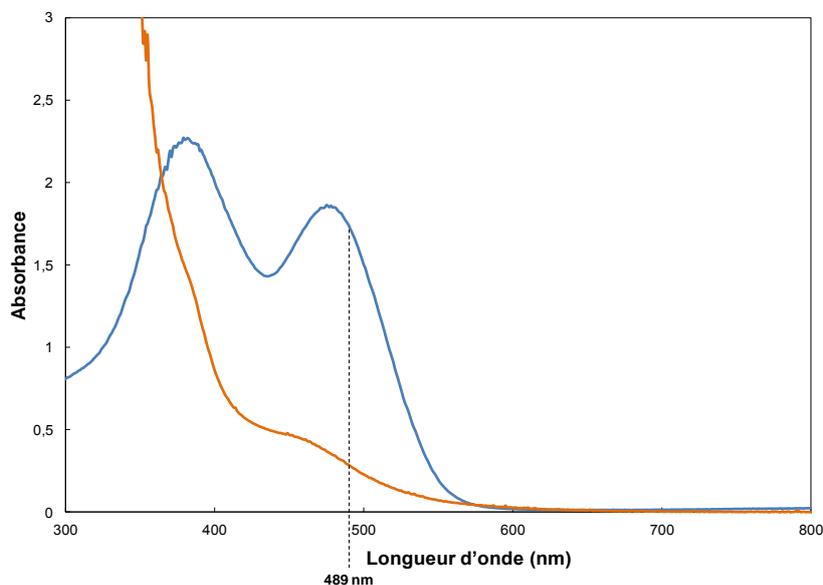


Figure 14 : Spectres UV-Vis d'une solution à 0,001 mol.L⁻¹ du complexe 1 dans méthanol à l'état fondamental (en bleu) et après oxydation en Fe^{III} (en orange).

Ainsi, la figure 15 montre l'évolution de la concentration en Fe^{II}-MeN₄Py en présence d'hydroperoxydes de squalène (concentration initiale 0,007 mol.L⁻¹) en fonction des solvants organiques.

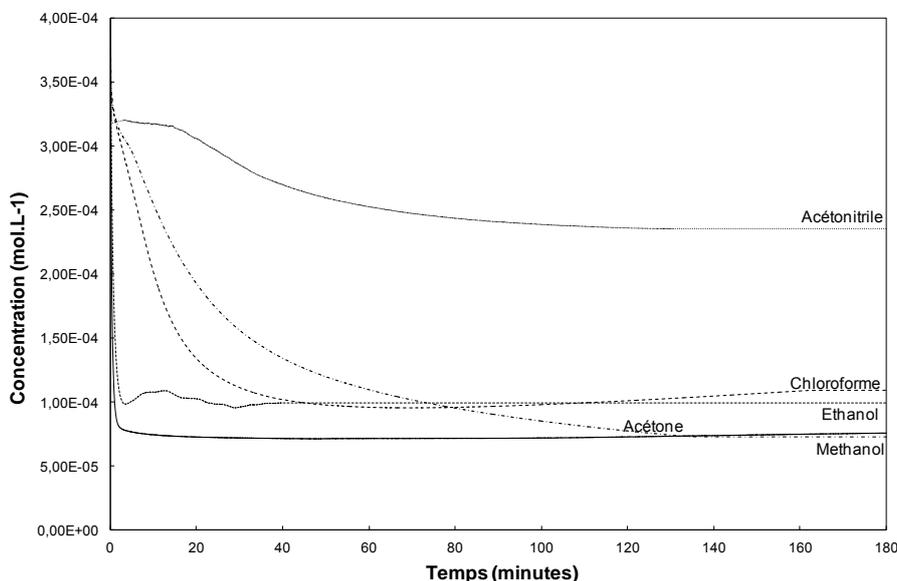


Figure 15 : Evolution de la concentration de Fe^{II} – MeN₄Py (5 équivalents) en présence de SQ(OOH)₆ (100 équivalents) en fonction du temps, dans différents solvants organiques. ($\lambda = 489 \text{ nm}$).

Trois tendances ressortent. Dans l'éthanol et le méthanol, l'absorbance chute immédiatement après l'ajout des SQ(OOH)₆. Dans l'acétone et le chloroforme, l'oxydation du complexe nécessite respectivement 2h et 40 minutes avant d'atteindre un palier équivalent à celui obtenu dans les alcools.

Enfin, dans l'acétonitrile, solvant le plus polaire, nous avons pu constater que l'absorbance ne chute que de 20 % en 60 minutes avant de se stabiliser. D'après la loi de Beer-Lambert, l'absorbance est directement liée à la concentration de l'échantillon ; le zéro ayant été réalisé sur la solution d'hydroperoxydes. Ainsi, la conversion du catalyseur peut directement être définie par le rapport des absorbances au temps 0 et après 3 heures (tableau 6). Nous avons de la sorte pu définir que le pourcentage de conversion du complexe catalytique ne dépasse pas 83%. Cependant, le ligand, composé de cycles pyridine est coloré et se décompose en chromophores, pouvant expliquer la décoloration partielle de la solution.

	$E^{\circ}_{\text{Fe(III)/Fe(II)}} \text{ (V)}$	% de conversion de FeMeN_4Py	% de conversion des SQ(OOH)_6 après 3h	
			UV	Dosage
Acétone	0.84	82	48,8	44
Acétonitrile	0.831	39	71,8	72
Chloroforme	0.97	71	79,5	63
Ethanol	/	76	20,5	40
Méthanol	/	83	38	31,9

Tableau 6 : Pourcentage de conversion du complexe FeMeN_4Py et des hydroperoxydes de squalène après 3 heures de réaction dans différents solvants organiques. (Conditions : $\text{FeMeN}_4\text{Py} / \text{SQ(OOH)}_6$ 5 / 100 – 20°C)

Afin de corrélérer les résultats de la partie précédente à ceux obtenus par spectrométrie UV, nous baserons notre raisonnement sur la possibilité que l'oxydation de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-MeN}_4\text{Py}$ soit réalisée en plusieurs étapes, chacune utilisant des SQ(OOH) , comme présenté sur le schéma 6 :

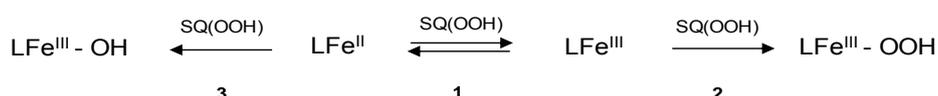


Schéma 6 : Schéma simplifié des possibles voies réactionnelles du complexe $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-MeN}_4\text{Py}$ en présence d'hydroperoxydes de squalène.

Pour commencer, nous avons pu constater que dans le méthanol et l'éthanol, en quelques minutes seulement, 80% du complexe $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{II}}$ se trouve oxydé alors que la conversion des peroxydes est progressive. L'hypothèse d'une interaction entre le complexe et le solvant, stabilisant le complexe sous son état Fe(II) et convertissant progressivement les SQ(OOH)_6 , est donc totalement réfutée. La chute brutale de l'absorbance suggère une oxydation très rapide de $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{II}}$ en $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{III}}$, tandis que le palier semble indiquer que l'étape 2 est prédominante.

Dans l'acétonitrile, l'effet semble inversé. La lente décroissance de l'absorbance semble indiquer que l'étape 1 du cycle catalytique, basée sur le couple redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, est prédominante. Une fois l'intermédiaire $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{III}}$ formé il paraît être instantanément réduit par les SQ(OOH)_6 en $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{II}}$ d'où un

maintient de l'absorbance, alors que nous avons pu enregistrer une importante conversion des peroxydes dans le milieu.

Dans l'acétone, nous avons pu voir précédemment que la conversion des peroxydes suit la même évolution que dans l'éthanol. Or l'analyse par spectrométrie UV indique une oxydation de $L_{5N}Fe^{II}$ plus lente que dans le cas des alcools. Par conséquent, nous supposons une stabilisation du complexe soit par la formation d'un complexe avec le solvant sur le sixième site de coordination de Fe^{2+} laissé vacant par l'anion, soit par la formation de liaisons hydrogènes entre le solvant et l'intermédiaire $LFe^{III}-OOH$, le stabilisant et ralentissant son oxydation (figure 16), afin d'expliquer cette différence.



Figure 16 : Formation hypothétique de liaisons hydrogènes entre l'intermédiaire $LFe^{III}-OOH$ et le solvant stabilisant alors l'hydroperoxo-ferrique.⁷³

Par ailleurs, dans le chloroforme, le complexe semble suivre une cinétique d'oxydation similaire à celle dans l'acétone pour atteindre un palier en 50 minutes alors que la titration des peroxydes suit la même tendance que dans l'acétonitrile. Ces discordances entre les résultats ne nous permettent pas de conclure quant à un mécanisme prédominant pour ce système, de même qu'il est difficile d'admettre une conclusion suite aux résultats obtenus dans l'acétone.

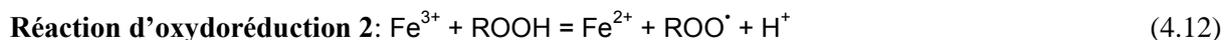
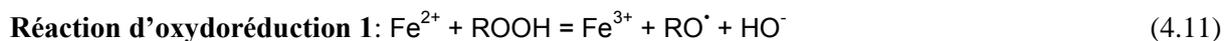
IV.1.4.4. Conclusion sur le système $Fe^{II}-MeN_4Py/SQ(OOH)_6$: discussion des mécanismes

Dans cette partie nous discuterons des différents mécanismes impliquant les hydroperoxydes de squalène et le complexe $Fe^{II}-MeN_4Py$.

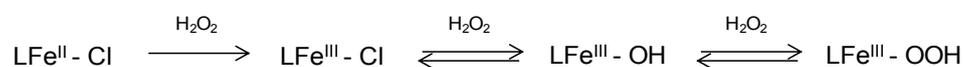
La réactivité des hydroperoxydes en présence des ions Fe^{2+} repose sur trois demi-équations redox :



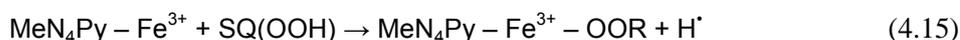
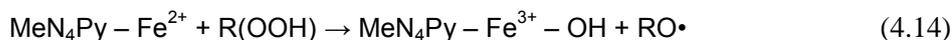
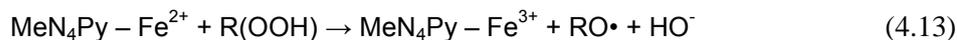
A partir de ces trois demi-équations redox, nous pouvons écrire deux principales équations d'oxydo-réduction :



Selon la littérature, le complexe MeN_4Py semble pouvoir interagir de deux manières différentes sur les peroxydes.^{37, 52} La voie (a) correspond au clivage homolytique de la liaison O – O des SQ(OOH) afin de former l'intermédiaire $\text{LFe}^{\text{III}}\text{-OH}$ (métaux réducteur). La voie (b) correspond à l'arrachement d'un hydrogène aux hydroperoxydes pour former alors $\text{LFe}^{\text{III}}\text{-OOR}$ (métaux oxydant). D'autre part, Balland et al, ont décrit les différents intermédiaires formés lors de l'oxydation de LFe^{II} en présence de peroxyde d'hydrogène,⁷⁴ tel que :



En nous appuyant sur l'ensemble de ces données, nous avons pu écrire trois équations impliquant $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-MeN}_4\text{Py}$ et SQ(OOH)_n , ici noté R(OOH) :



Par ailleurs, $\text{Fe}^{\text{III}} - \text{OOH}$ se forme en présence d'un excès d'oxydant, ce qui est notre cas puisque l'on se trouve en présence de 100 équivalents de SQ(OOH) porteur de 6 fonctions peroxydes pour 5 équivalents de complexe catalytique. De plus, en présence d'oxydant $\text{LFe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ peut continuer à s'oxyder pour former $\text{LFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ou $\text{LFe}^{\text{V}}=\text{O}$, mais aussi $\text{HO}\cdot$ responsables de l'activité catalytique des complexes (schéma 7).

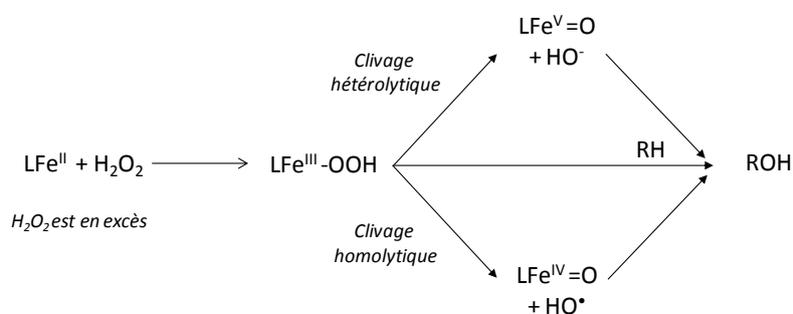


Schéma 7 : Différentes voies possible de décomposition l'intermédiaire $\text{LFe}^{\text{III}}\text{-OOH}$.⁴⁰

Le cycle catalytique accompagné des constantes de vitesses correspondantes, peut être schématisé en deux étapes (schéma 8). Nous n'avons pu démontrer par voltampérométrie cyclique que la réversibilité du couple redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ c'est pourquoi seule l'étape 1 est marquée par une double flèche. En fonction des textes scientifiques, il semblerait que d'autres étapes de ce cycle soient réversibles. Cependant, n'ayant pas de données sûres nous avons choisi de les symboliser par une flèche simple.

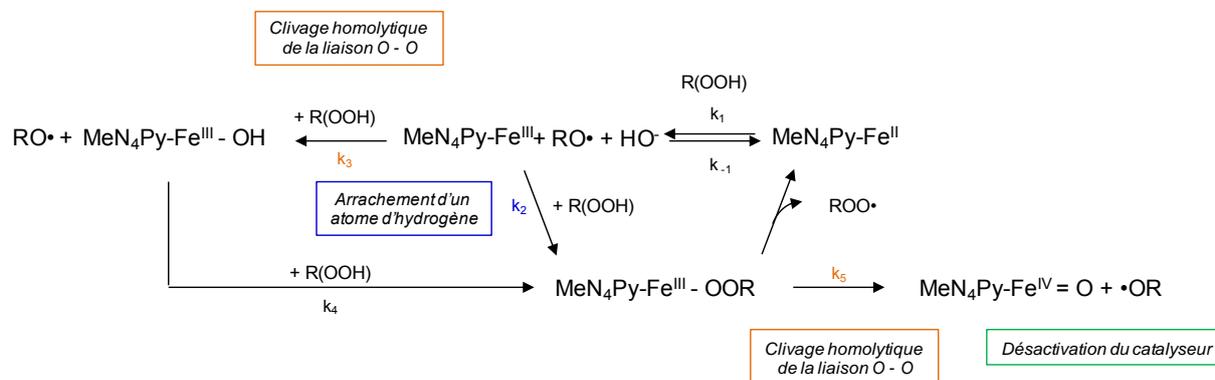


Schéma 8 : Schéma récapitulant les différentes voies d'oxydation possibles du complexe $\text{Fe-MeN}_4\text{Py}$ en présence d'hydroperoxydes de squalène ici symbolisés par R(OOH) .

Les constantes de vitesse semblent fortement dépendantes du solvant d'après ce que nous avons pu remarquer lors de la titration indirecte des hydroperoxydes ou le suivi de l'oxydation du complexe par spectrométrie UV.

Dans le méthanol et l'éthanol, nous avons observé une chute brutale de l'absorbance à 489 nm tandis que la conversion des hydroperoxydes s'est révélée progressive. En effet, l'oxydation du complexe $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{II}}$ semble très rapide (k_1 élevé) et irréversible tandis que sa régénération se trouve être très lente ($k_{-1} \lll k_1$). En corrélant les expériences et la littérature, nous suggérons que les intermédiaires LFe^{III} , $\text{LFe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ et $\text{LFe}^{\text{III}}\text{-OH}$ sont stabilisés dans le méthanol et éthanol (k_2 et k_3 faibles) d'où une consommation progressive des peroxydes. Cette favorisation des métaux oxydants, nous porte à croire que la réactivité du complexe et des hydroperoxydes repose sur un mécanisme par arrachement d'un atome d'hydrogène.⁷⁵ De plus, il se peut que $\text{LFe}^{\text{IV}}=\text{O}$, où L est instable, soit formé et stabilisé par la présence d'un atome d'oxygène dans les alcools, de même qu'il l'a été constaté en présence d'eau, pouvant entraîner, d'autre part, la dégradation du complexe.⁴⁰

Dans l'acétonitrile nos résultats suggèrent une oxydation rapide de Fe^{2+} , d'après la titration des peroxydes, mais également que celui-ci se régénère rapidement puisque l'absorbance ne diminue que de 40% ($k_{-1} \gg k_1$). Le maintien de la valeur de A_{489} , nous amène à conclure que l'étape 1 du cycle catalytique est la plus importante dans l'acétonitrile. Nous supposons que dans ces conditions, le solvant se complexe avec $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{II}}$ par substitution de l'anion Cl^- , afin de former $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CH}_3\text{CN})$, présentant une certaine stabilité. Ainsi en présence des hydroperoxydes de squalène $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CH}_3\text{CN})$

est oxydé en $L_{5N}Fe^{III}(CH_3CN)$, réduit à son tour en $L_{5N}Fe^{II}(CH_3CN)$ par $SQ(OOH)_6$ d'après les réactions d'oxydo-réduction 1 et 2. Il semblerait ainsi que $Fe^{III}-OH$ et $Fe^{III}-OOH$ ne se forment pas ou en très faible quantité, ce qui permet une conservation du complexe catalytique dans le temps. Ainsi $L_{5N}Fe^{II}$ est favorisé dans ces conditions impliquant un mécanisme d'action par clivage homolytique de la liaison O–O.

Dans l'acétone et dans le chloroforme, la discussion des résultats est beaucoup plus délicate de par les discordances résultant des analyses. En effet, dans l'acétone, le dosage des peroxydes montre une diminution progressive des groupements –OOH de même que la diminution de l'absorbance à 489 nm confirme l'oxydation de $L_{5N}Fe^{II}$ en $L_{5N}Fe^{III}$. Cependant la différence de cinétique avec le suivi réalisé dans les solvants alcooliques semble étayer l'hypothèse d'une stabilisation de l'intermédiaire $LFe^{III}-OOH$ par des liaisons hydrogènes mais peut également marquer une régénération modérée de Fe^{2+} avec $k_{-1} < \{k_1 \text{ et } k_2 \text{ ou } k_3\}$, et $k_1 < k_2 \text{ ou } k_3$

Dans le chloroforme le suivi UV semble prédire une cinétique d'oxydation de Fe^{2+} proche de celle dans l'acétone. Cependant, le dosage des peroxydes révèle une conversion rapide des groupements –OOH laissant alors penser que $k_1(\text{chloroforme})$ est supérieure à $k_1(\text{acétone})$. L'hypothèse de la formation d'un complexe LFe^{II} -solvant n'est pas à négliger et pourrait permettre d'expliquer la cinétique intermédiaire d'oxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+} . La mise en avant par le coefficient de diffusion d'un possible transfert de charge entre le ligand et le centre métallique peut justifier les différences observées avec l'acétone.

A l'heure actuelle, les résultats nous permettent de suggérer des voies réactionnelles préférentielles entre les hydroperoxydes de squalène et le complexe ferreux en fonction du milieu sans pour autant nous permettre d'identifier les intermédiaires formés.

Néanmoins, dans tous les cas, en réagissant avec les peroxydes, le complexe ferreux peut entraîner le clivage homolytique de la liaison O–O des groupements O–O–H et la formation de radicaux alcoyles mais aussi de radicaux hydroxyles (équation 4.16).



La formation de radicaux hydroxyles $HO\cdot$ est à l'origine d'un mécanisme radicalaire en chaîne dans le milieu par réaction avec les catalyseurs ou les hydroperoxydes présents dans la solution selon les mécanismes suivants⁷⁶ :





Celle des radicaux alcoyles, peut être le point de départ de la dégradation des hydroperoxydes de squalène, comme il l'a été démontré par voie thermique dans le chapitre 2. La réactivité entre le catalyseur et les hydroperoxydes étant très importante, $\text{MeN}_4\text{Py-Fe}$ semble donc catalyser la formation des composés volatiles observés à 80°C, mais cette fois-ci à température ambiante. Les produits issus de la décomposition des peroxydes seront étudiés dans la partie IV.1.6. de ce chapitre.

IV.1.5. Dégradation des $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ en présence de Fe^{II} -bispidone et oxydation du complexe par les hydroperoxydes de squalène

IV.1.5.1. Suivi par titration de la décomposition des hydroperoxydes en présence de Fe^{II} -bispidone

La réactivité des hydroperoxydes de squalène avec le complexe Fe-bispidone a également été évaluée, par dosage des motifs $-\text{OOH}$, dans les 5 solvants sélectionnés. La figure 17, représentant la conversion des peroxydes en présence de Fe-bispidone, est très différente de celle obtenue avec Fe- MeN_4Py .

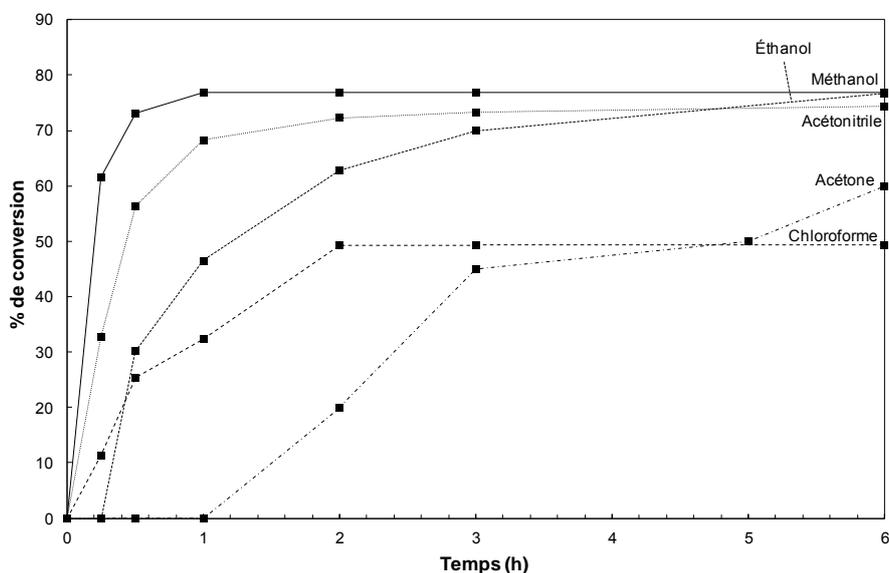


Figure 17 : Suivi par dosage indirect à l'iode de la conversion des hydroperoxydes de squalène $\text{SQ}(\text{OOH})_6$ en présence du catalyseur **2** dans différents solvants organiques. (Conditions : catalyseur **2** / hydroperoxydes de squalène – 5 / 100).

Dans l'acétonitrile et le méthanol, les vitesses initiales sont respectivement égales à 1,13 et 1,46 h^{-1} . En 2 heures, un palier est atteint avec une conversion de 76,9% et de 74,3% des peroxydes. Le

système Fe-bispidone/SQ(OOH)₆ évolue différemment dans l'éthanol, présentant un temps de latence de 15 minutes et une cinétique plus lente que dans le méthanol et l'acétonitrile, pour atteindre également 76% de conversion après 6 heures de réaction. Dans le chloroforme, nous avons obtenu une conversion maximale de 49,3% en 2 heures avec une vitesse initiale moyenne de 0,51 h⁻¹. Enfin, dans l'acétone, une période de latence d'une heure est observée avant le début de la conversion des peroxydes. Le tableau 7 résume l'ensemble des données obtenues pour le système Fe-bispidone/SQ(OOH)₆.

Solvant	Moment dipolaire D ⁶⁵	E° _{Fe(III)/Fe(II)} (V)	Vitesse initiale (h ⁻¹)	% de conversion à 6h	Temps nécessaire pour atteindre le palier
Acétone	2,88	0,97	0	60	> 6h
Acétonitrile	3,92	1,17	1,13	74,3	2h
Chloroforme	1,04	1,11	0,51	49,3	2h
Ethanol	1,69	/	0,60	76,7	>6h
Méthanol	1,70	0,85	1,46	76,9	1h

Tableau 7 : Résumé de la vitesse initiale (en h⁻¹) de conversion, du pourcentage de conversion après 6 heures, de la durée nécessaire pour l'obtention d'un palier pour les systèmes [BispidoneFe^{II}Cl]Cl / SQ(OOH)₆ en fonction des solvants employés et de leur moment dipolaire.

L'oxydation du complexe [bispidoneFe^{II}Cl]Cl s'effectue selon le même mécanisme que celui du catalyseur **1** en présence d'oxydant, car tous deux sont pentadentés. La littérature a mis en avant de nombreuses fois l'influence du ligand sur la réactivité du catalyseur, en accord avec nos propres résultats.³³

Si nous reprenons le cycle catalytique proposé pour le complexe Fe^{II}-MeN₄Py, schéma 9, nous avons :

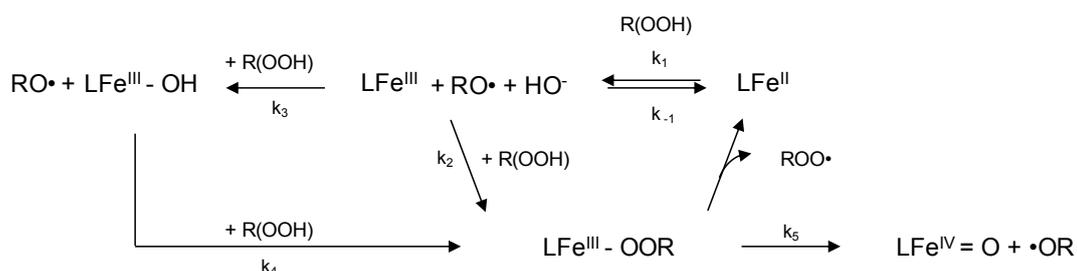


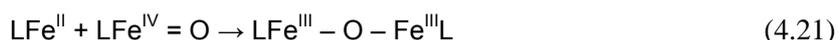
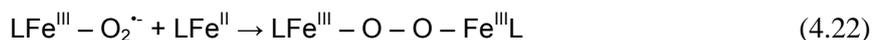
Schéma 9 : Schéma des différentes voies réactionnelles proposé à la suite des expériences réalisées sur les hydroperoxydes de squalène en présence du MeN₄Py-Fe^{II}.

Bien que les voies réactionnelles soient identiques pour les deux complexes étudiés, la réactivité du catalyseur **2** semble fortement influencée par la polarité du milieu. En comparant avec les cinétiques obtenues pour le complexe **1** nous pouvons émettre l'hypothèse que dans l'acétonitrile et dans le

méthanol, l'étape 1 du cycle est prédominante.³³ Semblablement la cinétique d'oxydation en présence d'hydroperoxydes est rapide et le taux de conversion élevé.

Dans l'éthanol, la période d'induction de 15 minutes laisse présager une interaction avec le solvant dans un premier temps, avant le début de la réaction d'oxydo-réduction entre le complexe et les hydroperoxydes. Il en est de même dans l'acétone où il se peut qu'un complexe stable $[L_{5n}Fe^{II} \text{ solvant}]$ soit produit, par formation d'une liaison entre le solvant et le sixième site de coordination du métal central, laissé libre par Cl^- , retardant ainsi son oxydation par $SQ(OOH)$.

Enfin dans le chloroforme, les hydroperoxydes de squalène semblent rapidement réduits avant d'observer une stabilisation du milieu à 50% de conversion. L'hypothèse relatant de la formation de liaisons hydrogène avec l'hydroperoxo-ferrique, stabilisant ainsi l'intermédiaire, permet d'expliquer la cinétique. Cependant, la possible formation de dimères selon les mécanismes suivants n'est pas à écarter :⁵⁷



En effet, les dimères ne pouvant plus réagir avec les hydroperoxydes, la conversion des peroxydes dans le milieu se trouve diminuer de moitié par rapport aux autres solvants.

IV.1.5.2. Discussion des mécanismes d'oxydation du catalyseur, précurseur de la dégradation des hydroperoxydes de squalène

Les complexes Fe-MeN₄Py et Fe-bispidone présentent certaines similitudes mais aussi quelques différences. L'oxydation du complexe **2**, de couleur jaune, au contact des hydroperoxydes entraîne également la formation d'intermédiaires oxydés voire sa décomposition. Dans cette partie nous discuterons des différentes voies réactionnelles possibles lors de l'interaction du complexe Fe-bispidone avec les $SQ(OOH)_6$.

L'oxydation de Fe^{II}-bispidone peut être repérée par spectrométrie UV à 385 nm. Le tableau 8 regroupe les données concernant l'évolution de l'absorbance. Les expériences n'ont pu être réalisées dans l'acétone étant donné que dans ce solvant la solubilité du complexe catalytique est limitée et la solution trouble. Le suivi de l'absorbance à une longueur d'onde donnée s'est révélé difficile à cause de la saturation du signal à des longueurs d'ondes inférieures à 375 nm et à une non-évolution de celui-ci aux alentours de 400 nm. Nous avons donc choisi de réaliser deux spectres, au temps 0 et après 3 heures de réaction et de relevé les valeurs à 385 nm, afin de montrer l'évolution du système.

Néanmoins, l'absence de suivi par spectrométrie UV, similaire au Fe-MeN₄Py, reste un frein à l'élucidation des mécanismes impliqués.

	$E^{\circ}_{\text{Fe(III)/Fe(II)}}$	Absorbance à 385 nm de Fe-bispidone	
	(V)	0 h	3 h
Acétonitrile	1,17	1,57	2,29
Chloroforme	1,11	1,12	1,83
Ethanol	/	1,69	2,52
Méthanol	0,85	1,85	2,80

Tableau 8 : Conversion du complexe Fe-bispidone et des hydroperoxydes de squalène après 3 heures de réaction dans différents solvants organiques. (Conditions : Fe-Bispidone / SQ(OOH)₆ 5 / 100 – 20°C)

A 385 nm, une augmentation de l'absorbance est directement liée à l'oxydation du complexe L_{5N}Fe^{II}.

D'après les résultats que nous avons obtenus, il semblerait que l'acétonitrile et le méthanol favorisent l'oxydation du complexe en LFe^{III}. En revanche, dans l'acétone et l'éthanol, nous avons pu suggérer l'éventualité d'une interaction solvant-complexe marquée. La formation de liaisons hydrogènes ou la complexation avec le solvant expliquerait le retard de phase mais aussi une évolution modérée des quantités de –OOH dans le milieu au cours du temps. Dans tous les cas, le complexe se trouvera oxydé, ce qui en accord avec l'accroissement de la valeur de A₃₈₅. Dans le chloroforme, la conversion des peroxydes, stabilisée à 50%, ainsi qu'une faible évolution de l'absorbance, laissent supposer la formation de dimères, non réactifs en présence des hydroperoxydes de squalène.

Par ailleurs, le croisement des textes scientifiques et de nos résultats permet de schématiser les différentes voies réactionnelles (schéma 10):

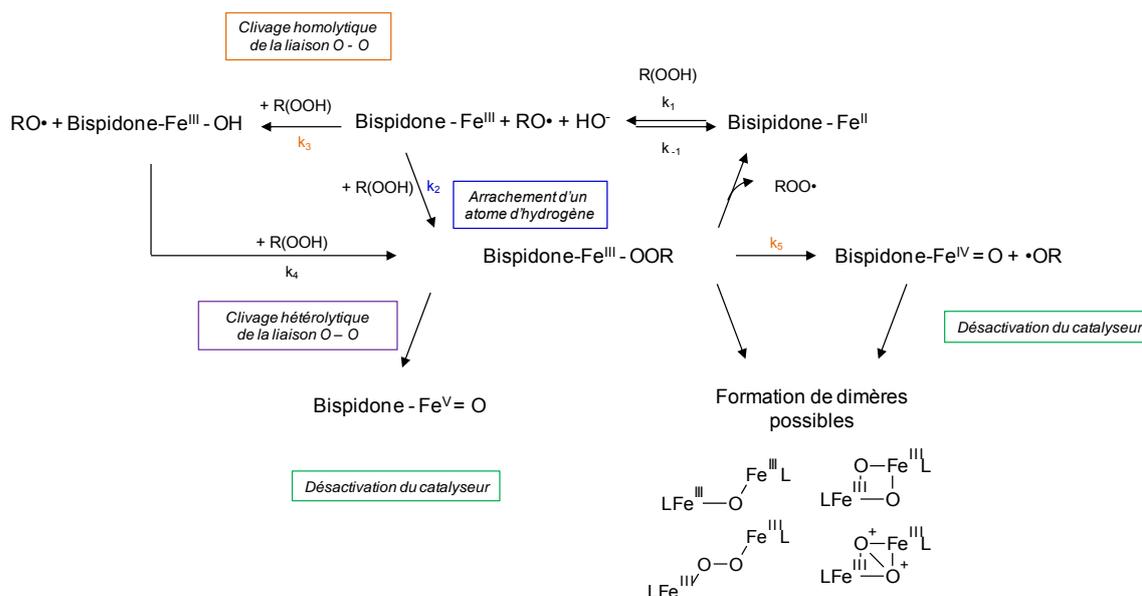


Schéma 10 : Schéma récapitulant les différentes voies d'oxydation possibles du complexe Fe-bispidone en présence d'hydroperoxydes de squalène ici symbolisés par R(OOH).

Dans le cas des complexes à base de bispidone, le transfert de charges entre le ligand et le métal central semble influencer la réactivité du complexe avec les hydroperoxydes. La littérature a mis en avant qu'un transfert de charge important entre le ligand et l'ion métallique, entraîne une augmentation de la charge du centre métallique et de la réactivité du catalyseur en présence d'oxydant préconisant un clivage homolytique de la liaison O – O plutôt que l'arrachement d'un atome d'hydrogène au groupement ROOH. Le couplage des résultats de titration indirecte à l'iode des peroxydes et des coefficients de diffusion dans le chloroforme oriente la conclusion dans cette voie. Par ailleurs, la similitude des résultats obtenus dans l'acétonitrile pour les deux complexes étudiés, suggère que dans le cas de Fe-bispidone, le mécanisme basé sur le clivage homolytique de la liaison O – O prédomine dans l'acétonitrile et le méthanol. Ainsi, de même que lors de l'étude des systèmes Fe-MeN₄Py/SQ(OOH)₆ le complexe à base de bispidone entraîne la formation de radicaux alcoyles d'où une réaction radicalaire peut se propager et produire des composés organiques volatils selon un mécanisme d' α ou β scission, ce que nous allons tenter de vérifier dans le paragraphe suivant.

IV.1.6. Identification des produits issus de la décomposition des SQ(OOH) en présence des catalyseurs Fe-MeN₄Py et Fe-bispidone

IV.1.6.1. Elaboration du protocole expérimental

En présence des catalyseurs, les hydroperoxydes disparaissent comme le montre les dosages en retour à l'iode. L'étude de la dégradation thermique des hydroperoxydes de squalène a permis d'identifier un certain nombre de produits résultants du clivage des SQ(OOH)₆. Ces COVs ont été précisément identifiés et quantifiés par RMN c'est pourquoi cette technique sera une nouvelle fois utilisée ici.

Pour réaliser cette étude, le squalène a été oxydé par ¹O₂ engendré chimiquement par décomposition du peroxyde d'hydrogène catalysée par les ions molybdate. Cette voie de formation des hydroperoxydes se trouve être beaucoup plus reproductible et contrôlable que la méthode photochimique. Ainsi il a été aisé de réaliser une série d'échantillons présentant des degrés de peroxydation évolutifs allant de n = 1 à n = 6.

Pour commencer, les hydroperoxydes isolés ont été mis en contact direct avec les complexes **1** et **2** ; or cette manip s'est soldée par une petite explosion. Il est donc indispensable de réaliser cette réaction en solution. Les molécules formées lors de la scission des hydroperoxydes étant de faible masse moléculaire, l'évaporation du solvant est prohibée afin de conserver l'ensemble des composés formés. Le choix s'est ainsi porté sur la dégradation catalytique des hydroperoxydes directement dans 1 mL de solvant deutéré, le CDCl₃.

La dégradation des hydroperoxydes de squalène en présence des catalyseurs a été étudiée précédemment dans le chloroforme dans des proportions catalyseur/hydroperoxydes de 5/100. Les résultats ont démontré qu'au bout de 3 heures d'expérience, la réaction atteint un palier. Dans le cas du complexe $[\text{MeN}_4\text{PyFe(II)Cl}]\text{Cl}$, le taux de conversion des SQ(OOH)_n en produits secondaires est de 63% tandis que pour le $[\text{BispidoneFe(II)Cl}]\text{Cl}$ il est de 49,3 %. Les conditions seront conservées pour cette partie des expériences. Les quantités de produits secondaires formés seront déterminées en ppm par mg d'hydroperoxydes introduits initialement en prenant en considération le taux de conversion partiel des peroxydes. Enfin, les catalyseurs étant ferromagnétiques, il est indispensable de les retirer du milieu réactionnel, par filtration sur silice, avant l'analyse RMN.

IV.1.6.2. Quantification des produits issus de la décomposition catalytique des hydroperoxydes de squalène par Fe-MeN₄Py et Fe-bispidone

Dans le chapitre 2, l'étude de la thermolyse des hydroperoxydes de squalène a permis de mettre en évidence des produits caractéristiques de chacune des scissions en fonction de la nature de l'hydroperoxyde, tertiaire ou secondaire. L'analyse et la quantification des produits issus du système $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{II}}/\text{SQ(OOH)}$ a pour objectif de définir les mécanismes mis en jeu lors de l'interaction des hydroperoxydes avec les complexes pentadentés.

Le dosage des hydroperoxydes a démontré leur réactivité au contact des catalyseurs dans les solvants organiques. En fonction des degrés de peroxydation de la molécule de squalène, il y a plus ou moins de groupements – OOH le long de la chaîne, susceptibles de réagir avec les complexes ferreux, pour former des radicaux alcoyles précurseurs d'une réaction radicalaire à l'origine du clivage des peroxydes. Avant tout, nous avons réalisé une étude succincte qui a permis de réfuter toute influence du degré d'oxydation n des SQ(OOH)_n sur l'activité catalytique des complexes $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{II}}$.

Le tableau 10 regroupe les résultats que nous avons obtenus lors de la dégradation des échantillons d'hydroperoxydes de squalène présentant différents degrés de peroxydation, par le « steel » et le « stainless ». Les conditions d'expérimentation étant les mêmes, la comparaison des résultats est possible grâce à la quantification des produits formés ; pour plus de justesse les résultats seront exprimés en ppm par mg de SQ(OOH)_n dégradés.

Quel que soit les degrés de peroxydation des hydroperoxydes de squalène, l'acétone et la méthacroléine sont les produits majoritairement formés (tableau 9). Avec l'augmentation des degrés de peroxydation, nous avons observé d'autres produits secondaires tels que le méthanol, l'acroléine et l'acétate d'éthyle. Dans la majorité des cas étudiés, l'acétone est engendrée en quantité plus importante que la méthacroléine. Seuls les échantillons formés à partir de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$ et $1,4 \text{ mol.L}^{-1}$ de peroxyde d'hydrogène, génèrent la méthacroléine comme produit majoritaire lors de

leur réaction avec les complexes ferreux. Cependant, on peut remarquer que dans ces cas, la différence entre les deux principaux composés est moindre que dans les autres essais.

SQ(OOH) _n		Acétone	Méthacroléine	Méthanol	Acroléine	Acétate d'éthyle
0.2 M H ₂ O ₂ SQ(OOH) _{1 à 3}	Steel	4	4			
	Stainless	3	4			
0.4 M H ₂ O ₂ SQ(OOH) _{1 à 5}	Steel	16	12			
	Stainless	13	6			
0.6 M H ₂ O ₂ SQ(OOH) _{1 à 5}	Steel	24	16			
	Stainless	21	22	0,5		
0.8 M H ₂ O ₂ SQ(OOH) _{1 à 5}	Steel	16	17			
	Stainless	14	18			
1 M H ₂ O ₂ SQ(OOH) _{2 à 6}	Steel	22	3			
	Stainless	9	2			
1,2 M H ₂ O ₂ SQ(OOH) _{2 à 6}	Steel	25	21	1	2	
	Stainless	11	11	0,4		
1,4 M H ₂ O ₂ SQ(OOH) _{4 à 6}	Steel	3	5			
	Stainless	9	12			
1,6 M H ₂ O ₂ SQ(OOH) _{4 à 6}	Steel	56	18			
	Stainless	87	22		3	22
1,8 M H ₂ O ₂ SQ(OOH) _{4 à 6}	Steel	47	23			
	Stainless	36	7		0,6	3

Tableau 9 : Dégradation catalytique des hydroperoxydes de SQ en fonction de leurs degrés de peroxydation – Quantification des COVs formés (ppm/mg). Le produit majoritaire pour chaque degré de peroxydation du squalène et pour chaque catalyseur est en bleu.

Pour l'ensemble des échantillons présentant des degrés de peroxydation similaires, nous avons calculé la quantité moyenne d'acétone, de méthacroléine et des autres COVs a été calculée. La figure 18 représente ces valeurs, pour chaque mélange de SQ(OOH)_n, pour le catalyseur **1** et le complexe **2**. Dans le cas du complexe **1** [MeN₄PyFe(II)Cl]Cl, on remarque que la quantité moyenne de produits formés augmente avec les degrés de peroxydation. Dès que le mélange contient des SQ(OOH)_n avec n > 3, l'acétone est le produit majoritaire.

Pour le complexe **2**, [BispidoneFe(II)Cl]Cl, l'évolution de la quantité de COVs émise est moins régulière. On peut également remarquer que lorsque le mélange contient des degrés de peroxydation supérieurs à 3, l'acétone est le produit majoritaire. Alors que pour le « steel » la quantité de COVs augmente avec n , une discontinuité est perceptible pour les mélanges de $SQ(OOH)_2$ à 6 .

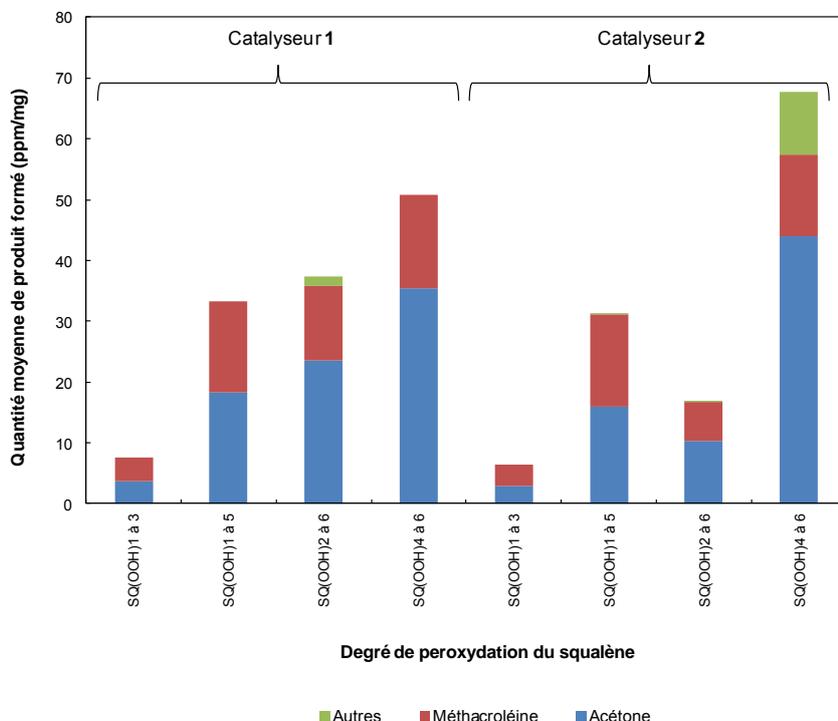


Figure 18 : Représentation des quantités moyennes de produits formés par les hydroperoxydes de squalène en présence des catalyseurs 1 et 2 en fonction du degré de peroxydation du squalène.

La dégradation des peroxydes en solution nous permet de conserver l'ensemble des composés issus de cette dégradation. Cependant, les spectres RMN se révèlent être assez pauvres. La filtration peut être la cause de cet appauvrissement du nombre de composé puisque les plus hydrophiles tels que les hydroperoxydes résiduels ou les époxydes peuvent se retrouver retenus par la silice.

IV.1.6.3. Mécanisme de dégradation des hydroperoxydes de squalène en présence de complexe ferreux

L'analyse par RMN a permis de mettre en évidence les principaux volatils formés. En constatant la similitude des résultats obtenus par les deux voies de dégradation des $SQ(OOH)_n$, catalytique et thermique, on peut affirmer que les mécanismes de dégradation sont identiques. L'oxydation des complexes ferreux entraînent, notamment dans le chloroforme, la formation de radicaux alcoxyyles à l'origine des mécanismes d' α et β scission (figure 19). L'obtention de l'acétone comme produits

largement majoritaire confirme la dominance de la scission de type α des hydroperoxydes tertiaires et secondaires.

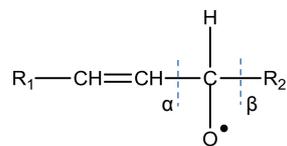


Figure 19 : α et β scission d'un radical alcoyle.

L'influence du ligand sur l'interaction du complexe avec les oxydants est également démontrée. En effet, dans des conditions identiques, les quantités moyennes de produits formés en fonction du degré de peroxydation sont différentes en particulier pour les mélanges à base de SQ(OOH)₄ à ₆. Pour les deux complexes, le mécanisme d'oxydation dans le chloroforme est majoritairement initié par un clivage homolytique de la liaison O – O des peroxydes. Ainsi, dans ce milieu, des radicaux RO• sont majoritairement formés, permettent d'obtenir des conditions similaires à celles de la thermolyse. Les conclusions quand à la formation des COVs sont donc semblables : **1**) au plus le squalène est oxydé, au plus la quantité de COVs émise est importante, **2**) l'acétone est majoritaire.

IV.1.7. Conclusion générale des systèmes $LFe^{II}/SQ(OOH)_6$

Les résultats obtenus par l'étude de l'oxydation des catalyseurs en présence d'hydroperoxydes de squalène, couplé à l'identification des produits de dégradation provenant des $SQ(OOH)_6$ sont encourageants.

La comparaison des mécanismes d'un même système $L_{5N}Fe^{II}/SQ(OOH)_6$ dans différents solvants organiques, appuyée par la littérature, établit l'importance du milieu réactionnel pour le mécanisme d'oxydation des complexes ferreux. Le ligand joue également un rôle important aux vues des nombreuses différences observées entre Fe-MeN₄Py et Fe-bispidone, il semblerait que la polarité du solvant n'a pas d'influence majeure sur la réactivité du complexe contrairement à sa structure chimique (présence d'atome d'oxygène ou pas), sa basicité ou encore sa capacité à transférer des doublets d'électrons ou site métallique. En effet, la possibilité pour le solvant de substituer la place de l'anion Cl⁻ au sein du complexe ferreux, modifie la réactivité du complexe mais aussi les potentiels des couples redox Fe^{3+}/Fe^{2+} .

La rigidité du ligand influence également l'interaction du complexe avec les ROOH. En effet, le ligand de type bispidone, présente une structure à base de bispidine plus rigide que celle du ligand de type N₄Py. Excepté dans le chloroforme, la conversion plus importante des peroxydes en présence de ce dernier confirme une meilleure réactivité du complexe lorsque le ligand est plus rigide.

La prévision, grâce au potentiel électrochimique, de la réactivité d'un complexe ferreux en présence de peroxydes dans différents milieux organiques n'est pas possible. Cependant, des rapports d'Unilever préconisent que plus le potentiel du couple Fe^{III}/Fe^{II} d'un complexe est faible, plus ce dernier est réactif en présence de ROOH. Cette tendance se vérifie dans la comparaison de deux complexes différents dans un même solvant mais pas dans celle d'un complexe dans différents solvants. Par exemple, dans l'acétone et le chloroforme, les valeurs de E° sont plus faibles pour le complexe **1** tandis que les vitesses initiales de conversion des peroxydes sont plus importantes. Cependant, pour ce catalyseur, dans l'acétonitrile, on a $E^\circ(\mathbf{1}) < E^\circ(\mathbf{2})$, alors que les réactivités des systèmes semblent équivalentes remettant en cause cette théorie, dans les solvants organiques.

De manière générale, pour les complexes ferreux portant un ligand pentadenté, la formation des intermédiaires oxydés en présence des hydroperoxydes de squalène peut se résumer de la manière suivante (schéma 11) :

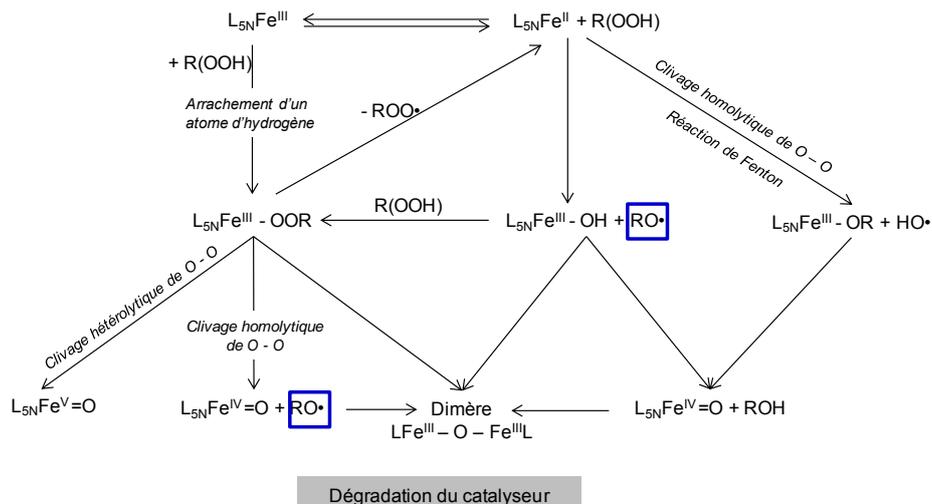


Schéma 11 : Schéma récapitulatif des intermédiaires obtenues en fonction des mécanismes d'oxydation envisageables lors de la réaction des complexes $Fe-MeN_4Py$ et Fe -bispidone avec des hydroperoxydes de squalène.

Par ailleurs, il est nécessaire de souligner que la réaction des catalyseurs en présence des $SQ(OOH)$ est simultanée à la dégradation de ces derniers. Ainsi la longueur de la chaîne du squalène par rapport aux oxydants plus traditionnellement employé, tel que le peroxyde d'hydrogène, n'est pas un problème. En effet, nous supposons que les hydroperoxydes en bout de chaîne étant plus facilement accessibles ils interagissent en premier avec le complexe, afin de former $LFe^{III}-OOR \rightarrow LFe^{III}-O^{\bullet} + RO^{\bullet}$. Une fois le radical alcoyle clivé en acétone ou méthacroléine, le motif $-OOH$ formé sur la seconde double liaison du squalène peut alors interagir à son tour avec le complexe ferreux et ainsi de suite.

De plus, cette étude nous a également permis de montrer que la dégradation catalytique des peroxydes s'effectue selon les mêmes mécanismes que par voie thermique (schéma 12).

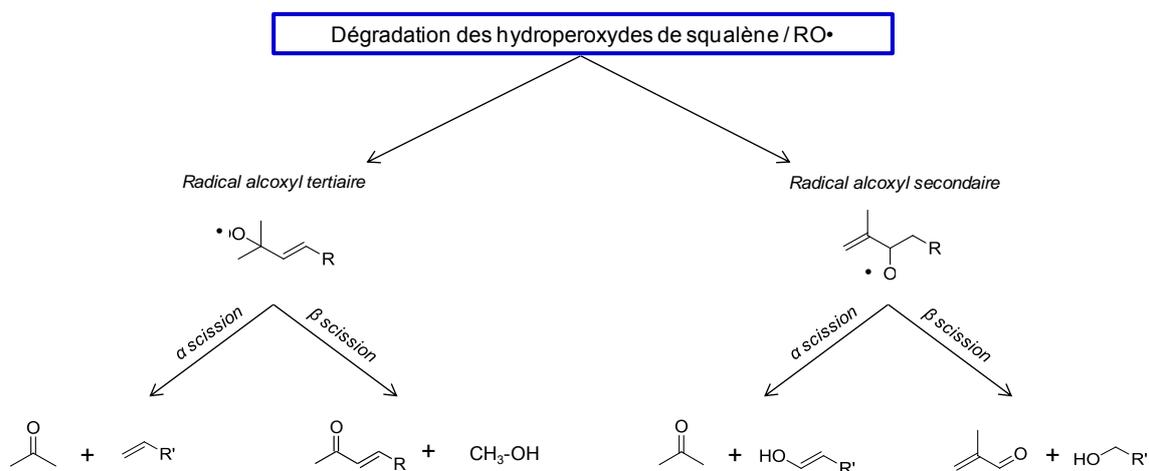


Schéma 12 : Schéma récapitulatif des principales réactions engendrant les COVs par le système $L_{5N}Fe^{II}/SQ(OOH)_n$.

Alors que la voie thermique nécessite une température minimale de 80°C pour obtenir une propagation radicalaire conséquente et la formation efficace de COVs, en présence de catalyseurs de type $L_{5N}-Fe^{II}$ elle se trouve être rapidement initiée, à température ambiante. Le clivage homolytique de la liaison O – O par le complexe favorise la formation des radicaux alcoxyles et donc la scission des peroxydes en COVs. Les conditions optimales de cette voie réactionnelle pour Fe-MeN₄Py semblent nécessiter un solvant exempt d'atomes d'oxygène (chloroforme et acétonitrile). La réactivité de Fe-Bispidone est quand à elle optimisée dans des milieux polaires, présentant des constantes diélectriques élevées, ici, l'acétonitrile et le méthanol.

En conclusion, bien que le complexe Fe-MeN₄Py soit plus stable en présence d'oxydant nos résultats font apparaître que le Fe-bispidone (« stainless ») serait préférable pour des applications potentielles dans les détergents textiles ou dans les produits capillaires qui sont utilisés en milieux aqueux. Ainsi, le sébum peroxydé, riche en hydroperoxydes de squalène et présents sur le linge et le cuir chevelu peut être converti en divers produits de dégradation ou non irritants et légèrement parfumés.

IV.2. Perspectives : dégradation des hydroperoxydes par voie enzymatique

IV.2.1. Présentation du projet

La dégradation des hydroperoxydes par les enzymes est bien connue par la voie de la lipoxigénase. De façon plus générale toutes les hydroperoxyde-lyases (HPO-lyase) sont capables de cliver de manière sélective les hydroperoxydes d'acide gras. Pour cela, ces protéines repèrent la liaison C-C à rompre par rapport à la fonction acide de la molécule. Ainsi, la 13-HPO-lyase de l'acide linoléique clive la liaison en position 13 entraînant la production de l'hexenal entre autres (schéma 13).

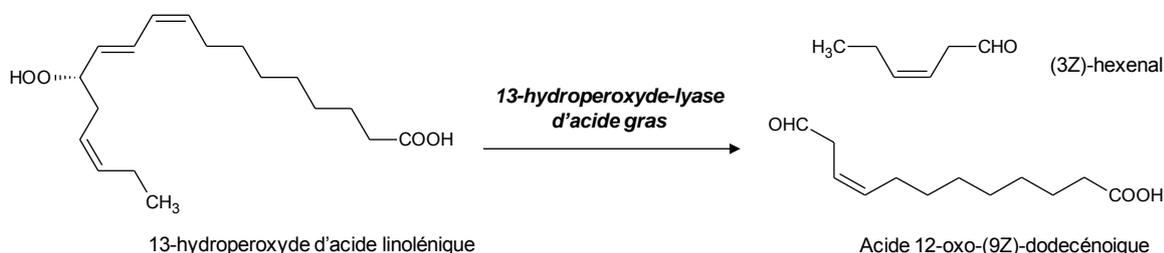


Schéma 13 : Décomposition du 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique par la 13-HPO-lyase.⁷⁷

En nous inspirant de ce processus, il nous a semblé intéressant d'explorer la voie enzymatique pour induire le clivage des hydroperoxydes de squalène. Ce travail a été réalisé en collaboration avec la société *Protéus* basée à Nîmes et spécialisée dans l'ingénierie et la production de nouvelles enzymes. En 2004, Firmenich a déposé un brevet en partenariat avec eux (*Patent US 6 78 621 B2, Guava (psidium gualava) 13-hydroperoxide lyase and uses thereof, Aug. 24,2004*). Ce brevet décrit une séquence enzymatique particulière capable de cliver efficacement les hydroperoxydes d'acide linoléique en position 13 par différentes lyases. Etant donné que ce brevet ne concerne que les hydroperoxydes d'acide gras, il laisse ouvert le clivage des hydroperoxydes terpéniques. Unilever a donc demandé à Protéus de tester ces enzymes HPO-lyases sur les hydroperoxydes de squalène afin de juger de leur capacité à cliver les SQ(OOH) en molécules volatiles, bien qu'ils ne présentent pas de fonction carboxylique. Un total de 12 enzymes (E3640 à E3651) a été préparé par Protéus. Leur activité enzymatique a été validée sur un mélange d'isomères d'hydroperoxydes d'acide linoléique formés par photooxydation. Dans le cadre de ce partenariat nous étions en charge de préparer par voie photochimique les échantillons de mono-, di-, tri-, tétra-, penta- et hexa-hydroperoxydes de squalène. Le suivi de la scission des SQ(OOH)_n a été réalisé par HPLC en utilisant la méthode séparative élaborée dans le chapitre 2.

IV.2.2. Dégradation des hydroperoxydes par les 13-hydroperoxyde-lyases

IV.2.2.1. Essai de dégradation des hydroperoxydes de squalène par l'hydroperoxyde-lyase

8 échantillons d'hydroperoxydes de squalène (tableau 10) ont été testés par 12 enzymes 13-HPO-lyase selon le protocole suivant :

- Suspension cellulaire : 100 μL
- Hydroperoxydes de squalène : 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
- Tampon au phosphate : 880 μL

Sous agitation et à température ambiante, 150 μL du milieu réactionnel sont dilués à 150 μL de méthanol. Le mélange est centrifugé et le surnageant est injecté en HPLC pour contrôler la dégradation des hydroperoxydes de squalène.

Numéro de l'échantillon	Processus de fabrication	Conditions	Temps de réaction	SQ(OOH) _n
1	Photooxydation	Dichlorométhane / TPP ¹	3h	n = 1 à 5
2	Photooxydation	Dichlorométhane / TPP ¹	10h	n = 4 à 6
3	Photooxydation	Méthanol / RB ²	1h	n = 1 à 5
4	Photooxydation	Méthanol / RB ²	10h	n = 6
5	Photooxydation	Dichlorométhane / TPP ³	1h30	n = 1 à 5
6	Photooxydation	Dichlorométhane / TPP ³	10h	n = 4 à 6
7	Photooxydation	Méthanol / RB ²	10 minutes	n = 1 à 3
8	« Dark singlet oxygenation »	Methanol / sodium molybdate / 0.2M d'H ₂ O ₂	/	n = 1 à 3

Tableau 10 : Description des échantillons d'hydroperoxydes de squalène testés par Protéus sur les hydroperoxyde-lyases.

Quelque soit l'enzyme associée à l'échantillon d'hydroperoxydes de squalène, aucune conversion n'a été observée. En effet il n'y aucune évolution de l'échantillon d'après le suivi HPLC, que ce soit pour les échantillons additionnés ou non d'enzyme. Dans le but de concentrer l'activité enzymatique, les

¹ TPP : 5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphine from Sigma Aldrich – new sample of 2012

² RB : Rose Bengale

³ TPP : 5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphine from Sigma Aldrich – previous sample

enzymes ont été extraites pour 2 des 12 lyases testées (la E 3647 et la E3648) puis testés à nouveau sur les échantillons 7 et 8 de SQ(OOH). Bien qu'aucune conversion importante ne soit visible, une très faible évolution du substrat 7 en présence de l'extrait d'enzyme E3647 semble se produire. Suite à ces résultats, Unilever se procura 4 mL de la E 3647 auprès de *Protéus* afin de confirmer son activité sur les hydroperoxydes de squalène, par un suivi analytique par « head space -SPME » en CG.

IV.2.2.2. Essai de l'enzyme E3647 sur les hydroperoxydes de squalène

Durant deux semaines au sein des laboratoires de recherche d'Unilever de Port Sunlight, nous avons testé l'enzyme E 3647, fournie par *Protéus*, sur les hydroperoxydes de squalène. L'objectif était de corroborer l'observation par CLHP d'une diminution de la quantité de SQ(OOH)_{1 à 3} dans le milieu, en détectant et en quantifiant cette fois-ci les produits obtenus, grâce à un suivi par un système headspace SPME en CG-SM.

Pour ce faire une solution méthanolique à 0,03 mol.L⁻¹ de SQ(OOH)_{1 à 3} a été diluée dans 15 mL d'eau distillée afin d'obtenir une solution à 0,1 mM de peroxydes. Dans 1 mL de la solution alors obtenue, 20 µL d'enzymes sont ajoutés et la solution est analysée en CG-SM par SPME. Il a été précédemment établi que la quantité de méthanol n'inhibe pas l'enzyme car elle n'est que de 6 % dans la solution enzymatique. En parallèle, un échantillon de contrôle, sans enzyme est préparé. Les échantillons sont analysés, en alternant l'échantillon contenant l'E3647 et celui de contrôle. Ainsi des résultats à des temps réguliers sont enregistrés.

La comparaison des chromatogrammes obtenus révèle une dégradation des hydroperoxydes, entraînant la libération des volatils identiques que ce soit avec ou sans enzyme. Néanmoins, alors que la quantité de volatils augmente au cours du temps en absence d'enzyme, celle-ci diminue en présence d'E3647 jusqu'à devenir nulle. Nous avons alors émis l'hypothèse d'une stabilisation des SQ(OOH) par l'enzyme, puis nous avons réalisé deux expériences complémentaires. D'une part le degré d'oxydation des peroxydes est rehaussé de 1 à 5 afin d'examiner si cette augmentation ne peut pas accroître les quantités de volatils émises. D'autre part, les quantités d'enzymes sont diminuées afin d'évaluer l'influence de l'enzyme sur la désactivation des peroxydes. Pour ce faire, les volumes de la solution d'E3647 seront respectivement divisés par 2 et par 4. Par ailleurs le pH est également ajusté aux alentours de 6. Pour cela, la dilution de la solution méthanolique de SQ(OOH)_n a été réalisée dans une solution tampon de MES de pH 6. En effet, les solutions de peroxydes de squalène utilisées pour les tests avec les enzymes ont un pH compris entre 8 et 9. Or, la gamme de pH d'activité des enzymes hydroperoxyde-lyases va de 6 à 9.

L'accroissement du degré de peroxydation semble défavorable à l'activité enzymatique. Par ailleurs, ni l'augmentation, ni la diminution de la quantité de bio protéines ne s'avère favorable à un accroissement de la quantité de COVs. Les mêmes conclusions négatives sont alors à noter concernant l'influence du pH sur les résultats finaux. En conclusion, les expériences réalisées à PortSunlight sur l'activité enzymatique de l'hydroperoxyde-lyase en présence de SQ(OOH)_n démontre l'absence d'activité enzymatique de l'E3647 sur cette cible.

Conclusion

Dans l'objectif de toujours améliorer les performances des lessives tout en respectant l'environnement, le linge et la peau, les industriels de la détergence se sont inspirés de processus naturels afin de les transposer dans leur formulation. Aujourd'hui plusieurs enzymes sont présentes dans les lessives pour décolorer certaines tâches d'origine naturelle. Par ailleurs, la dégradation enzymatique des hydroperoxydes d'acide linoléique permet de libérer des odeurs aux notes vertes tandis que les tâches hydrophobes se trouvent blanchies grâce au dioxygène de l'air en présence de complexes à base de Fe^{II} pentadentés. Les catalyseurs tels que $\text{Fe-MeN}_4\text{Py}$ et Fe-bispidone ont été développés pour catalyser le blanchiment des tâches par oxydation chimique, en présence de peroxyde d'hydrogène.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, les hydroperoxydes de squalène sont les composés cibles à dégrader, que ce soit pour former des COVs présentant une bonne odeur, ou diminuer l'irritation cutanée. Les chapitres 2 et 3 ont permis de confirmer l'efficacité thermique pour la dégradation des hydroperoxydes de terpènes. Dans ce chapitre 4 les voies catalytique et enzymatique ont été explorées. Les études menées avec les hydroperoxydes-lyases n'ont pas donné une issue positive tandis que celles sur les catalyseurs $\text{Fe-MeN}_4\text{Py}$ et Fe-bispidone ont été beaucoup plus fructueuses. Les systèmes $\text{L}_{5\text{N}} - \text{Fe}^{\text{II}}/\text{SQ}(\text{OOH})$ ont montré une grande réactivité. Jusqu'à présent les études reposaient sur l'oxydation du complexe par O_2 ou H_2O_2 , formant des intermédiaires oxydés, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OH}$, $\text{Fe}^{\text{III}} - \text{OOH}$ ou $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, qui vont alors réagir sur le substrat pour former un époxyde ou un diol. Les expériences menées ici conduisent à des conclusions similaires quant à l'activité catalytique de ces complexes en présence des peroxydes de squalène. Ces derniers génèrent des radicaux alcoxyles, initiateur de réaction radicalaire en chaîne mais également de scissions à l'origine des COVs, selon le même mécanisme que par thermolyse. La titration des peroxydes dans le temps a confirmé cette dégradation. Par ailleurs, la RMN a validé l'émission de COVs et plus particulièrement d'acétone ou de méthacroléine.

Par souci de temps et d'efficacité, les recherches ont été menées dans des solvants organiques afin de faciliter la dilution des oxydants. Cependant, l'application de ces composés sera en milieux aqueux, d'où un fort intérêt à poursuivre les investigations dans ce milieu. Déjà employés et incorporés dans la formulation d'un certain nombre de produit détergent, les catalyseurs Fe^{II} pentacoordinés ont montré qu'au-delà d'être de bons agents de blanchiment, ils peuvent également dégrader efficacement $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ à température ambiante. Ces résultats ouvrent d'autres perspectives pour l'application et la valorisation de ces complexes en activateur de fragrances couplé à une fonction hypoallergénique.

Partie expérimentale

*I. Dégradation des hydroperoxydes par voie enzymatique***1) Formation des hydroperoxydes de squalène et préparation de la solution**

Les hydroperoxydes de squalène ont été formés par oxydation chimique. Dans 1 mL de méthanol, 0,03 mol.L⁻¹ de squalène et 0,05 mol.L⁻¹ de molybdate de sodium sont solubilisés grâce aux ultra-sons. Une fois l'obtention d'une solution homogène, le peroxyde d'hydrogène est additionnée à la solution à une concentration de 0,2 mol.L⁻¹ soit (20 µL d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 35 %).

Une fois la réaction terminée et les hydroperoxydes formés, la solution méthanolique est diluée dans 15 mL d'eau distillée afin d'obtenir une concentration de 1 mM d'hydroperoxydes. 1 mL de ce mélange est alors prélevé et introduit dans un vial GC de 20 mL, dans lequel quelques microlitres de solution enzymatique E 3647 sont ajoutés.

2) Suivi de disparition des SQ(OOH) par headspace-SPME en GC-MS

Le suivi analytique des composés formés a été réalisé sur une GC-MS de la marque Shimadzu (QP-2010) avec une colonne HP5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm). Les volatiles sont prélevés par un système headspace SPME (23-guage, 50/30 µm, DVB/CAR/PDMS, Supelco 57298-U). La fibre est introduite 10 minutes dans le vial avant de l'être dans l'injecteur chauffé à 270°C. La durée de désorption de la fibre est de 1 minute. La température du four est maintenue à 40°C pendant 3 minutes puis augmentée jusqu'à 280°C à raison de 2°C par minute. La température de la source d'ionisation est de 200°C. L'enregistrement débute après 2 minutes 30 afin de ne pas polluer les chromatogrammes avec des pics trop proéminants.

*II. Dégradation des hydroperoxydes par voie catalytique***1) Dégradation des hydroperoxydes de squalène par les catalyseurs en solution**

135 mg d'hydroperoxydes de squalène (100 équivalents par rapport au catalyseur) sont dilués dans 25 mL de solvants. Au temps 0, 3 mL de cette solution sont prélevés puis 5 équivalents de complexes catalytiques (mg de Fe-MeN₄Py ou 8,2 mg de Fe-bispidone) sont ajoutés sous agitation et à température ambiante. Au temps choisi, 3 mL de la solution sont prélevés et dosé selon le protocole décrit ci-dessous.

solvant	Masse d'hydroperoxydes		Masse de catalyseur (mg)	Volume (mL)
	initiale (mg)			
Acétone	144		7,7	25
Acétonitrile	131,5		6,2	25
Chloroforme	133,3		6,2	25
Ethanol	140,5		6,3	25
Méthanol	132,7		6,3	25

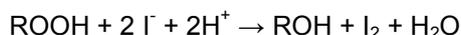
Tableau 12 : Conditions expérimentales de dosage pour les systèmes Fe-MeN₄Py/SQ(OOH)₆ dans les différents solvants étudiés.

solvant	Masse d'hydroperoxydes		Masse de catalyseur (mg)	Volume (mL)
	initiale (mg)			
Acétone	134,1		8,2	25
Acétonitrile	134,2		8,3	25
Chloroforme	133,6		8,2	25
Ethanol	138,3		8,6	25
Méthanol	144		8,2	25

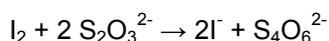
Tableau 13 : Conditions expérimentales de dosage pour les systèmes Fe-bispidone/SQ(OOH)₆ dans les différents solvants étudiés.

2) Dosage indirecte des hydroperoxydes par iodométrie

Le dosage des hydroperoxydes suit les données de la norme AFNOR NFT 60-220. 3 mL de la solution contenant les hydroperoxydes à titrer est introduit dans un erlenmeyer de 100 mL. Afin de solubiliser les hydroperoxydes 37,5 mL d'une solution chloroforme/ acide acétique (40:60, v/v) sont ajoutés. Puis 1,5 mL d'une solution saturée de KI (14,3 g dans 10 mL d'eau distillée) sont additionnés à la solution qui sera alors agitée pendant 1 minute, avant d'être mise à l'abri de la lumière pendant 5 minutes. Les groupements –OOH réagissent alors avec les ions iodures selon la réaction ci-dessous :



Ces premières étapes exécutées, la réaction entre les hydroperoxydes et les ions iodure I⁻ est stoppée par l'ajout de 120 mL d'eau distillée. La solution est ensuite divisée en 3 portions de 50 mL chacune. Chaque portion est alors titrée par une solution à 0,025 mol.L⁻¹ de thiosulfate de sodium pentahydrate :



A proximité de la zone de virage (disparition de la couleur jaune), quelques gouttes d'une solution d'empois d'amidon sont ajoutées. L'équivalence est atteinte lorsque la coloration bleu-noire de la

solution a totalement disparu. La concentration d'hydroperoxydes contenus alors dans la solution initiale est donc de :

$$C_{ROOH} = \frac{0,5 \times V_{eq} \times C_{Na_2S_2O_3}}{V_0}$$

Avec C_{ROOH} : la concentration totale d'hydroperoxydes

$C_{Na_2S_2O_3}$: la concentration de la solution de thiosulfate de sodium pentahydrate

V_{eq} : le volume de la solution de thiosulfate additionné au point d'équivalence

V_0 : le volume de la solution initiale d'hydroperoxyde additionné.

3) Voltampérométrie cyclique

Les mesures ont été réalisées en utilisant un voltampéromètre voltalab 40 couplé à un radiomètre PGZ 301 opérant avec une vitesse de balayage allant de 10 à 1000 $mV.s^{-1}$. Les études ont été réalisées sous argon, dans les différents solvants organiques (acétonitrile, acétone, chloroforme, méthanol, éthanol) en utilisant 0,1 $mol.L^{-1}$ de tétrabutylammonium tétrafluoroborate comme électrolyte et 0,001 $mol.L^{-1}$ de complexe. L'électrode de travail est en carbone vitreux. L'électrode de référence est en calomel saturé en KCl (+ 0,24 V / ENH). Tous les potentiels sont donnés par rapport à l'électrode standard à hydrogène ($E^\circ = 0$ V). L'électrode auxiliaire est en platine. Les mesures ont été réalisées avec une vitesse de balayage de 100 $mV.s^{-1}$ entre -1200 et 1500 V, et à température ambiante (25°C).

4) Suivi par spectrométrie UV de l'oxydation des complexes Fe^{II} par les $SQ(OOH)_n$

Les mesures de spectrométrie UV-Vis ont été réalisées sur un spectromètre Cary 50 probe (Varian). 2 mL d'une solution contenant 0,02 $mol.L^{-1}$ de $SQ(OOH)_6$ (24 mg d'hydroperoxydes de squalène purs obtenus par voie chimique après l'ajout de 2 $mol.L^{-1}$ de peroxyde d'hydrogène par pas de 0,2 $mol.L^{-1}$) est introduite dans la cuve UV en quartz d'une largeur de 1cm. Le « zéro » est réalisé sur cette solution. 200 μL d'une solution à 0,01 $mol.L^{-1}$ de complexe ferreux sont ajoutés afin d'obtenir une concentration de 0,001 $mol.L^{-1}$ de $L_{5N}Fe^{II}$ soit un ratio catalyseur/ $SQ(OOH)_6$ de 5/100. Les mesures sont réalisées sous agitation et à 20°C. L'évolution de l'absorbance est enregistrée à 489 nm pour le complexe Fe-MeN₄Py et à 385 nm pour le complexe Fe-bispidone.

5) Analyse des COVs formés par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)

La dégradation des peroxydes par interaction des complexes pentadentés a été réalisée directement dans 1 mL de CDCl_3 contenant $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de naphthalène (standard), selon les mêmes proportions que celles décrites dans la partie expérimentale II.1) de ce chapitre soit un ratio $\text{L}_{5\text{N}}\text{Fe}^{\text{II}}/\text{SQ}(\text{OOH})_n$ de 5/100.

Les catalyseurs Fe-MeN₄Py et Fe-bispidone sont des complexes ferromagnétiques, il est nécessaire de les retirer avant de passer les échantillons en RMN afin de ne pas perturber le champ magnétique de l'appareil. Pour cela, les solutions sont filtrées rapidement sur silice au travers d'une pipette pasteur. Ainsi une solution incolore contenant les produits secondaires est récupérée pour subir des expériences ¹H et COSY en RMN.

Les spectres RMN sont enregistrés sur un spectromètre Brüker Avance 300 équipé d'une sonde TXI à gradient de champ (300 MHz pour une analyse ¹H et 75 MHz pour un ¹³C).

La quantification par RMN est possible grâce à l'ajout de $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de naphthalène dans le milieu. Ce composé présente deux massifs caractéristiques à 7,5 et 7,8 ppm correspondant à 4 protons. Chacun de ces massifs sera donc intégré à 0.04 mol.L^{-1} . La quantification des produits présents dans le milieu sera calculée par l'intégration d'un des pics caractéristiques de ce composé divisée par le nombre de proton correspondant à ce massif.

Résultats :

[H ₂ O ₂] mol.L ⁻¹	SQ(OOH) _n n	Fe-MeN ₄ Py		Fe-Bispidone	
		m(SQ(OOH)) mg	[catalyseur] mol.L ⁻¹	m(SQ(OOH)) mg	[catalyseur] mol.L ⁻¹
0,2	SQ(OOH) _{1 to 3}	45,1	0,005	49,7	0,005
0,4	SQ(OOH) _{1 to 5}	42,5	0,005	40	0,005
0,6	SQ(OOH) _{1 to 6}	42,3	0,005	42,6	0,005
0,8	SQ(OOH) _{1 to 6}	49	0,005	47	0,005
1	SQ(OOH) _{3 to 6}	40,4	0,005	44,4	0,005
1,2	SQ(OOH) _{4 to 7}	41	0,005	42	0,005
1,4	SQ(OOH) _{4 to 7}	39,7	0,005	39,9	0,005
1,6	SQ(OOH) _{4 to 7}	40,6	0,005	36	0,005
1,8	SQ(OOH) _{5 to 7}	42,5	0,005	38	0,005

Tableau 14 : Conditions expérimentales de dégradation des hydroperoxydes de squalène, obtenus par oxydation chimique, par Fe-MeN₄Py et Fe-bispidone, dans CDCl_3 , à 25°C pour analyses par RMN.

Références bibliographiques du chapitre 4

1. R. Hage, A. Lienke, Applications of Transition-Metal Catalysts to Textile and Wood-Pulp Bleaching. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45(2): 206-222.
2. B.S. Lane, K. Burgess, Metal-Catalyzed Epoxidations of Alkenes with Hydrogen Peroxide. *Chem. Rev.*, **2003**, 103(7): 2457-2474.
3. W. Nam, High-Valent Iron(IV)-Oxo Complexes of Heme and Non-Heme Ligands in Oxygenation Reactions. *Acc. Chem. Res.*, **2007**, 40(7): 522-531.
4. B. Meunier, S.P. de Visser and S. Shaik, Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.*, **2004**, 104(9): 3947-3980.
5. J.T. Groves, High-valent iron in chemical and biological oxidations. *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100(4): 434-447.
6. M. Costas, M.P. Mehn, M.P. Jensen and L. Que, Dioxygen Activation at Mononuclear Nonheme Iron Active Sites: Enzymes, Models, and Intermediates. *Chem. Rev.*, **2004**, 104(2): 939-986.
7. S.V. Kryatov, E.V. Rybak-Akimova and S. Schindler, Kinetics and Mechanisms of Formation and Reactivity of Non-heme Iron Oxygen Intermediates. *Chem. Rev.*, **2005**, 105(6): 2175-2226.
8. M.T. Green, J.H. Dawson and H.B. Gray, Oxoiron(IV) in Chloroperoxidase Compound II Is Basic: Implications for P450 Chemistry. *Science (Washington, DC, U. S.)*, **2004**, 304: 1653-1656.
9. R.K. Behan, M.T. Green, On the status of ferryl protonation. *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100(4): 448-459.
10. F. Ogliaro, S.P. de Visser and S. Shaik, The 'push' effect of the thiolate ligand in cytochrome P450: a theoretical gauging. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 91(4): 554-567.
11. E.I. Solomon, A. Decker and N. Lehnert, Non-heme iron enzymes: Contrasts to heme catalysis. *P. Natl Acad. Sci.*, **2003**, 100(7): 3589-3594.
12. J.C. Bautz, P. Lopez, de Laorden Carlos, Menzel M., Rajaraman G., Biomimetic high-valent non-heme iron oxidants for the cis-dihydroxylation and epoxidation of olefins. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2007**, 46: 8067-8070.
13. P. Comba, G. Rajaraman and H. Rohwer, A Density Functional Theory Study of the Reaction of the Biomimetic Iron(II) Complex of a Tetradentate Bispidine Ligand with H₂O₂. *Inorg. Chem.*, **2007**, 46(10): 3826-3838.
14. M. Costas, K. Chen and L. Que Jr, Biomimetic nonheme iron catalysts for alkane hydroxylation. *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 200-202(0): 517-544.
15. G. Roelfes, *Models for Non-Heme Iron Containing, Oxidation Enzymes*. 2000, University of Groningen, Netherlands.
16. L. Feringa Ben, L. Marcel, R. M. Hermant, R. S. Twisker, L. Jr. Que, *Bleach and oxidation catalyst comprising an iron complex, especially for use in laundering*, **1995**, Unilever N.V., Neth.; Unilever PLC . WO9534628A1

17. M. Lubben, A. Meetsma, E.C. Wilkinson, B. Feringa and L. Que, Nonheme Iron Centers in Oxygen Activation: Characterization of an Iron(III) Hydroperoxide Intermediate. *Angew. Chem. Internat. Ed.*, **1995**. 34(13-14): 1512-1514.
18. G. Roelfes, M. Lubben, S.W. Leppard, E.P. Schudde, R.M. Hermant, R. Hage, E.C. Wilkinson, J.L. Que and B.L. Feringa, Functional models for iron-bleomycin. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **1997**. 117(1-3): 223-227.
19. G. Roelfes, M. Lubben, K. Chen, R.Y.N. Ho, A. Meetsma, S. Genseberger, R.M. Hermant, R. Hage, S.K. Mandal, V.G. Young, Y. Zang, H. Kooijman, A.L. Spek, L. Que, and B.L. Feringa, Iron Chemistry of a Pentadentate Ligand That Generates a Metastable FeIII-OOH Intermediate. *Inorg. Chem.*, **1999**. 38(8): 1929-1936.
20. G. Roelfes, M. Lubben, R. Hage, J.L. Que and B.L. Feringa, Catalytic Oxidation with a Non-Heme Iron Complex That Generates a Low-Spin FeIII-OOH Intermediate. *Chem. – Eur. J.*, **2000**. 6(12): 2152-2159.
21. B. L. Feringa, H.R., Howell S., Parry N. J., Roelfes J. G., Verrips C. T., *Preparation of targeted moieties to form transition metal complex with antibody labeling for use in bleach catalysts*, **2001**, Unilever Plc, UK; Unilever Nv; Hindustan Lever Ltd. . WO2001092455A1
22. H. Boerzel, P. Comba, R. Hage, M. Kerscher, J. Lienke, M. Merz, *Ligand and complex for catalytically bleaching a substrate*, **2002**, Unilever PLC, UK; Unilever NV; Hindustan Lever Limited . WO2002048301A1
23. P. Comba, , M. Kerscher, M. Merz, V. Müller, H. Pritzkow, R. Remenyi, W. Schiek and Y. Xiong, Structural Variation in Transition-Metal Bispidine Compounds. *Chem. – Eur. J.*, **2002**. 8(24): 5750-5760.
24. H. Börzel, C.P., K. S. Hagen, Y. D. Lampeka, A. Lienke, G. Linti, M. Merz, H. Pritzkow, L. V. Tsymbal, Iron coordination chemistry with tetra-, penta- and hexadentate bispidine-type ligands. *Inorg. Chim. Acta*, **2002**. 337(0): 407-419.
25. P. Comba, C. Haaf, M. Kerscher, A. Lienke, *Polydentate amino-substituted 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-9-one (Bispidon) ligands and their metal complexes as antitumor and contrast agents and aziridination or bleaching catalysts*, **2009**, Universitaet Heidelberg, Germany . WO2009010129A1
26. R. Hage, F. Gol, H. W. Gibbs, K. Maaijen, *Antiskinning compositions for coatings*, **2012**, OMG Additives Limited, UK . WO2012093250A1
27. J. Weijnen, D. Klomp, *Modified alkyd resins and use in coatings*, **2013**, PPG Europe BV, Neth. . WO2013045475A1
28. E.H. Farmer, H.P. Koch and D.A. Sutton, 144. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Part VII. Rearrangement of double bonds during autoxidation. *J. Chem. Soc. (Resumed)*, **1943**. 0(0): 541-547.
29. D.M.P.J. Van, R. Hage and S.M. Veerman, *Bleaching laundry composition with dye transfer inhibiting property*, **2001**, Unilever PLC, UK; Unilever NV; Hindustan Lever Limited . WO2001064824A1
30. K.D. Welch, T.Z. Davis and S.D. Aust, Iron Autoxidation and Free Radical Generation: Effects of Buffers, Ligands, and Chelators. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2002**. 397(2): 360-369.

31. K. Chen, M. Costas, J. Kim, A.K. Tipton and L. Que, Olefin Cis-Dihydroxylation versus Epoxidation by Non-Heme Iron Catalysts: Two Faces of an FeIII–OOH Coin. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**. *124(12)*: 3026-3035.
32. P. Comba, S. Fukuzumi, H. Kotani, S. Wunderlich, Electron-Transfer Properties of an Efficient Nonheme Iron Oxidation Catalyst with a Tetradentate Bispidine Ligand. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**. *49(14)*: 2622-2625.
33. M. R. Bukowski, P. Comba, A. Lienke, C. Limberg, C. Lopez de Laorden, R. Mas-Ballesté, M. Merz, L. Que, Catalytic Epoxidation and 1,2-Dihydroxylation of Olefins with Bispidine–Iron(II)/H₂O₂ Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**. *45(21)*: 3446-3449.
34. P. Comba, H. Wadepohl and S. Wiesner, Optimization of the Efficiency of Oxidation Catalysts Based on Iron Bispidine Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2011**. *2011(16)*: 2610-2615.
35. S. Taktak, W. Ye, A.M. Herrera and E.V. Rybak-Akimova, Synthesis and Catalytic Properties in Olefin Epoxidation of Novel Iron(II) Complexes with Pyridine-Containing Macrocycles Bearing an Aminopropyl Pendant Arm. *Inorg. Chem.*, **2007**. *46(7)*: 2929-2942.
36. R. Mas-Ballesté, M. Costas, T. van den Berg and L. Que, Ligand Topology Effects on Olefin Oxidations by Bio-Inspired [FeII(N₂Py₂)] Catalysts. *Chem. – Eur. J.*, **2006**. *12(28)*: 7489-7500.
37. Y. Mekmouche, S. Menage, J. Pécaut, C. Lebrun, L. Reilly, V. Schuenemann, A. Trautwein, M. Fontecave, Mechanistic Tuning of Hydrocarbon Oxidations with H₂O₂, Catalyzed by Hexacoordinate Ferrous Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2004**. *2004(15)*: 3163-3171.
38. C.V. Sastri, J. Lee, K. Oh, Y.J. Lee, J. Lee, T.A. Jackson, K. Ray, H. Hirao, W. Shin, J.A. Halfen, J. Kim, L. Que, S. Shaik, and W. Nam, Axial ligand tuning of a nonheme iron(IV)–oxo unit for hydrogen atom abstraction. *P. Nat. Ac. Sc.*, **2007**. *104(49)*: 19181-19186.
39. W.N. Oloo, A.J. Fielding and L. Que, Rate-Determining Water-Assisted O–O Bond Cleavage of an FeIII–OOH Intermediate in a Bio-inspired Nonheme Iron-Catalyzed Oxidation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**. *135(17)*: 6438-6441.
40. K. Chen, L. Jr. Que, Stereospecific Alkane Hydroxylation by Non-Heme Iron Catalysts: Mechanistic Evidence for an FeV:O Active Species. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**. *123*: 6327-6337.
41. R. Mas-Ballesté, M. Fujita, C. Hemmila and J.L. Que, Bio-inspired iron-catalyzed olefin oxidation. Additive effects on the cis-diol/epoxide ratio. *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **2006**. *251(1–2)*: 49-53.
42. F. Buda, B. Ensing, M.C.M. Gribnau and E.J. Baerends, DFT Study of the Active Intermediate in the Fenton Reaction. *Chem. – Eur. J.*, **2001**. *7(13)*: 2775-2783.
43. P. Comba, M. Maurer and P. Vadivelu, Oxidation of Cyclohexane by a High-Valent Iron Bispidine Complex: A Combined Experimental and Computational Mechanistic Study†. *J. Phys. Chem. A*, **2008**. *112(50)*: 13028-13036.
44. K. Chen, M. Costas, L. Jr. Que, Spin state tuning of non-heme iron-catalyzed hydrocarbon oxidations: participation of FeIII–OOH and FeV:O intermediates. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2002**: 672-679.

45. L.J. Park Mi Joo, S. Yumi, K. Jinheung, N. Wonwoo, Reactivities of Mononuclear Non-Heme Iron Intermediates Including Evidence that Iron(III)–Hydroperoxo Species Is a Sluggish Oxidant. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**. *128*(8): 2630-2634.
46. V.W. Bowry, K.U. Ingold, A radical clock investigation of microsomal cytochrome P-450 hydroxylation of hydrocarbons. Rate of oxygen rebound. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**. *113*: 5699-707.
47. A. Bassan, M.R.A. Blomberg, P.E.M. Siegbahn and L. Que, A Density Functional Study of O–O Bond Cleavage for a Biomimetic Non-Heme Iron Complex Demonstrating an FeV-Intermediate. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**. *124*(37): 11056-11063.
48. M.C. White, A.G. Doyle and E.N. Jacobsen, A Synthetically Useful, Self-Assembling MMO Mimic System for Catalytic Alkene Epoxidation with Aqueous H₂O₂. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**. *123*(29): 7194-7195.
49. I. Yamazaki, and L.H. Piette, EPR spin-trapping study on the oxidizing species formed in the reaction of the ferrous ion with hydrogen peroxide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**. *113*: 7588-93.
50. J. Bautz, M.R. Bukovski, M. Kerscher, A. Stubna, P. Comba, A. Lienke, E. Münck, L. Que, Formation of an Aqueous Oxoiron(IV) Complex at pH 2–6 from a Nonheme Iron(II) Complex and H₂O₂. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**. *45*(34): 5681-5684.
51. E.A. Duban, K.P. Bryliakov and E.P. Talsi, The Active Intermediates of Non-Heme-Iron-Based Systems for Catalytic Alkene Epoxidation with H₂O₂/CH₃COOH. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2007**. *2007*(6): 852-857.
52. D.Wang, K. Ray, M.J. Collins, E.R. Farquhar, J.R. Frisch, L. Gomez, T.A. Jackson, M. Kerscher, A. Waleska, P. Comba, M. Costas, and L. Que, Nonheme oxoiron(IV) complexes of pentadentate N5 ligands: spectroscopy, electrochemistry, and oxidative reactivity. *Chem. Sci.*, **2013**. *4*: 282-291.
53. Y-M Lee, H. Kotani, T. Suenobu, W. Nam, S. Fukuzumi, Fundamental Electron-Transfer Properties of Non-heme Oxoiron(IV) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**. *130*(2): 434-435.
54. W. Nam, R. Ho and J.S. Valentine, Iron-cyclam complexes as catalysts for the epoxidation of olefins by 30% aqueous hydrogen peroxide in acetonitrile and methanol. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**. *113*: 7052-4.
55. M. Selke, J.S. Valentine, Switching on the Nucleophilic Reactivity of a Ferric Porphyrin Peroxo Complex. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**. *120*(11): 2652-2653.
56. J. Kochany, J.R. Bolton, Mechanism of photodegradation of aqueous organic pollutants. 1. EPR spin-trapping technique for the determination of hydroxyl radical rate constants in the photooxidation of chlorophenols following the photolysis of hydrogen peroxide. *J. Phys. Chem.*, **1991**. *95*: 5116-20.
57. D. Tétard, A.Y., *Mechanistic study. study of the reactivity of steel with dioxygen.*, **2003**, I. R.-U.-P. 0027
58. R. Hage, J. Lienke and P. Veerman-Petersen, *Bispidone-derived ligands and complex for catalytically bleaching a substrate*, **2005**, Unilever PLC, UK; Unilever NV; Hindustan Lever Limited . WO2005042532A1
59. A. Lienke, S. Killeen, R. Hage, *The chemical background of stainless*, **2004**, I. R.-U.-. 0012

-
60. A. Lienke, , *How does stainless work?*, **2005**, I. r.-. Unilever
61. D. Apparao, L. Que, H. Logtenberg, A. van den Berg Tieme, Meetsma Auke, J. Killeen Scott, B. L. Feringa, R. Hage, G. Roelfes, W. R. Browne, Ligand Exchange and Spin State Equilibria of FeII(N4Py) and Related Complexes in Aqueous Media. *Inorg. Chem.*, **2011**. 51(2): 900-913.
62. W. Ye, D.M. Ho, S. Friedle, T.D. Palluccio and E.V. Rybak-Akimova, Role of Fe(IV)-Oxo Intermediates in Stoichiometric and Catalytic Oxidations Mediated by Iron Pyridine-Azamacrocycles. *Inorg. Chem.*, **2012**. 51: 5006-5021.
63. Wang Don, Z.M., Bühlmann Philippe, Que Lawrence, Redox Potential and C–H Bond Cleaving Properties of a Nonheme FeIV=O Complex in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**. 132(22): 7638-7644.
64. M. J. Collins, K. Ray, L. Que, Electrochemical Generation of a Nonheme Oxoiron(IV) Complex. *Inorg. Chem.*, **2006**. 45(20): 8009-8011.
65. W.M. Haynes, Handbook of chemistry and physics. 92nd edition ed, ed. Editor-in-chief. **2011**: CRC.
66. A.M. Afanassiev, K. Okazaki and G.R. Freeman, Effect of solvation energy on electron reaction rates in hydroxylic solvents. *J. Phys. Chem.*, **1979**. 83(10): 1244-1249.
67. Rahhal, S. and H.W. Richter, Reduction of hydrogen peroxide by the ferrous iron chelate of diethylenetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacetate. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**. 110: 3126-33.
68. V. Balland, M.-F. Charlot, F. Banse, J.-J. Girerd, T.A. Mattioli, E. Bill, J.-F. Bartoli, P. Battioni and D. Mansuy, Spectroscopic Characterization of an FeIV Intermediate Generated by Reaction of XO⁻ (X = Cl, Br) with an FeII Complex Bearing a Pentadentate Non-Porphyrinic Ligand – Hydroxylation and Epoxidation Activity. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2004**. 2004(2): 301-308.
69. D. Schröder, S. Shaik and H. Schwarz, Two-State Reactivity as a New Concept in Organometallic Chemistry§. *Acc. Chem. Res.*, **2000**. 33(3): 139-145.
70. J.D. Melton, B.H.J. Bielski, Studies of the kinetic, spectral and chemical properties of iron(IV) pyrophosphate by pulse radiolysis. *Radiat. Phys. Chem.*, **1990**. 36(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 725-33.
71. B. Ensing, F. Buda and E.J. Baerends, Fenton-like Chemistry in Water: Oxidation Catalysis by Fe(III) and H₂O₂. *The Journal of Physical Chemistry A*, **2003**. 107(30): 5722-5731.
72. B. Ensing, F. Buda, P.E. Bloechl and E.J. Baerends, A Car-Parrinello study of the formation of oxidizing intermediates from Fenton's reagent in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2002**. 4: 3619-3627.
73. D. Tétard, *Steel mechanism: Proposal for alternative molecules for steel - Improvement of ligand design*, **Novembre 2001**, I. r.-U.-P. 0533
74. V. Balland, F. Banse, E. Anxolabéhère-Mallart, M. Ghiladi, T.A. Mattioli, C. Philouze, G. Blondin, J.-J. Girerd, Fe(II) and Fe(III) Mononuclear Complexes with a Pentadentate Ligand Built on the 1,3-Diaminopropane Unit. Structures and Spectroscopic and Electrochemical Properties. Reaction with H₂O₂. *Inorg. Chem.*, **2003**. 42(7): 2470-2477.
-

75. F. Shahidi, Y. Zhong, Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39(11): 4067-4079.
76. J.N. Winter, *Rational design of laundry bleach catalyst: mechanistic insights from electron Spin Resonance studies of spin-trapped intermediates*, **2006**, I. r.-U.-P. 0205
77. K. Matsui, S.M., Hase T., Kajiwara T., Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Lett.*, **1996**, 394(1): 21-24.

_____ **C**onclusion générale

Les produits lessiviels sont constitués d'un mélange complexe de composés chimiques et leur formulation requière une haute technicité afin de répondre au cahier des charges imposé par toutes les attentes des consommateurs. Rappelons que les principales fonctions d'une lessive sont: **1)** d'éliminer les salissures du linge, **2)** d'assouplir le linge et d'éviter les transferts de couleurs, **3)** d'apporter au linge une odeur de « propre » durable dans le temps. Cette dernière tâche, bien qu'apparemment simple, nécessite cependant une grande maîtrise des phénomènes chimiques et physico-chimiques mis en jeu. En effet, l'ajout de parfum dans la formulation peut s'accompagner de nombreuses réactions secondaires résultant d'interactions avec les autres matières premières. Diverses techniques capables de préserver le parfum ont vu le jour telles que la microencapsulation ou les précurseurs de parfums qui restent cependant chers. Par ailleurs, REACH et les réglementations récentes limitent de plus en plus l'utilisation de certaines matières premières odoriférantes importantes (citral, géraniol, limonène...), à cause de leurs propriétés allergisantes.

C'est dans ce contexte que la société Unilever a mis récemment en évidence un phénomène surprenant et riche de potentialités : la dégradation oxydante du sébum dégage une odeur agréable au lieu de l'odeur rance habituellement émise lors de la dégradation oxydante des corps gras. Cette société nous a alors confié une étude visant à produire de façon contrôlée les hydroperoxydes intermédiaires, à analyser les composés émis en phase gazeuse et à élucider les mécanismes présidant leur formation. Le sébum est, en effet, une salissure omniprésente sur les textiles car il se forme à la surface de la peau. Lorsque les vêtements sont portés, il est transféré sur le linge, laissant des résidus, incrusté dans les fibres textiles, même une fois le linge lavé et séché. Cette sécrétion cutanée est principalement constituée d'acide gras insaturés mais également de 12% de squalène. L'oxydation des acides gras insaturés a fait l'objet d'études approfondies car elle intervient dans le métabolisme des végétaux et des humains et dans la dégradation des denrées alimentaires contenant des corps gras (**chapitre 1**). Le squalène moins étudié a été le sujet principal de ces travaux de thèse (**chapitre 2**). Triterpène, de formule chimique $C_{30}H_{50}$, il se compose de 6 doubles liaisons facilement oxydables. Les produits primaires d'oxydation, les hydroperoxydes, sont relativement instables. Ainsi ils peuvent facilement former des radicaux capables d'interagir avec les cellules de la peau et provoquer l'hyperpigmentation. Cependant, il semblerait que la dégradation des hydroperoxydes de squalène, formé par interaction avec 1O_2 , entraîne la libération de COVs, associés à une odeur de miel et de caramel. Cependant, une étude exhaustive de son oxydation est difficilement imaginable étant donné le nombre élevé d'hydroperoxydes isomères possibles. Afin de faciliter l'élucidation des mécanismes d'oxydation et de dégradation des hydroperoxydes résultants, nous avons étudié en parallèle une série de terpènes et de terpénoïdes modèles mono-, di- et tri-insaturés présentant la même sous-structure isoprénique que le squalène (**chapitre 3**). La décomposition des hydroperoxydes du squalène en COVs a été induite par trois méthodes : thermique, catalytique et enzymatique. L'approche suivie est schématisée ci-après (schéma 1).

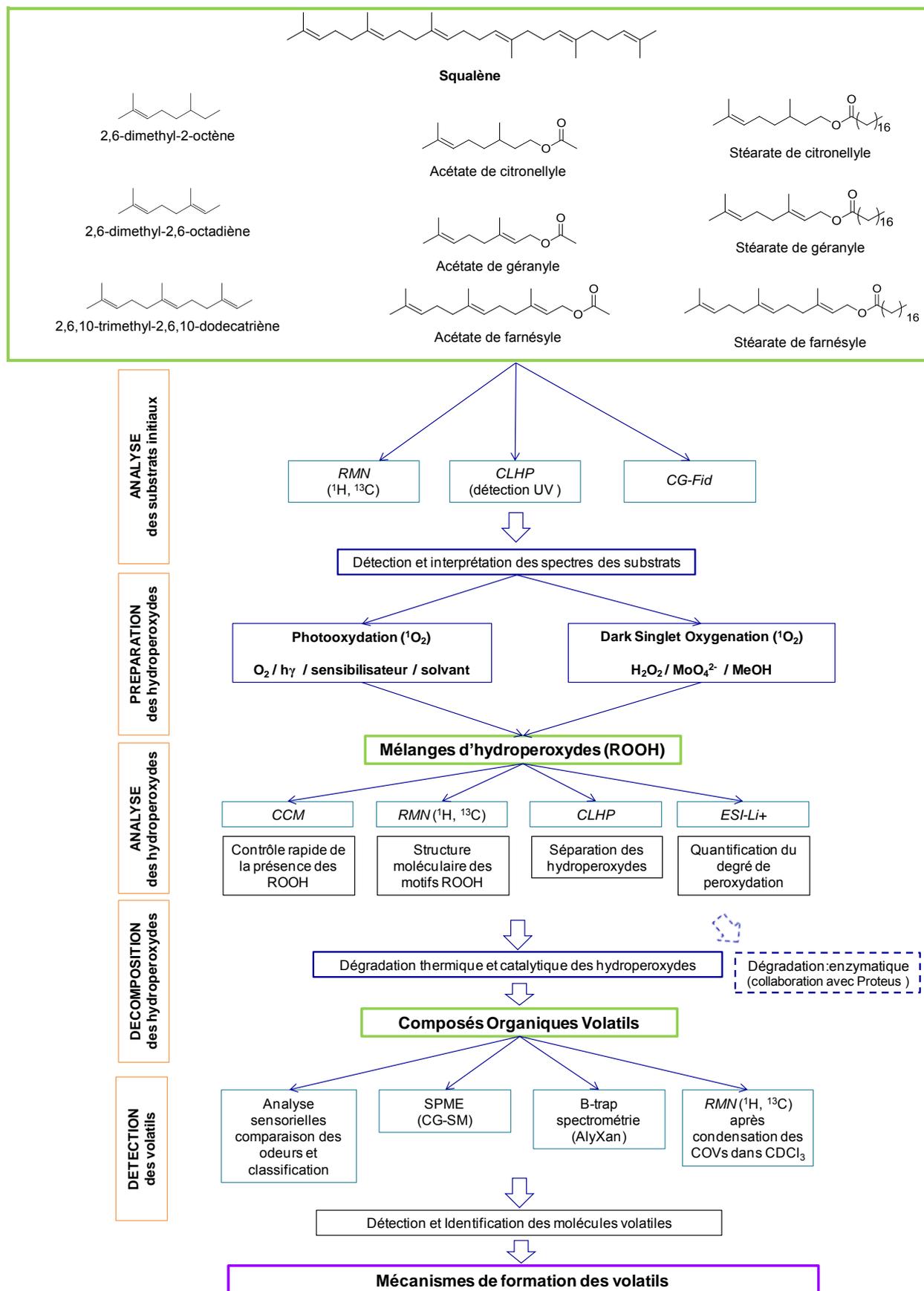


Schéma 1 : Trame générale suivie pour les travaux de thèse.

Dans le **chapitre 1** nous avons effectué un état de l'art sur l'oxydation des acides gras insaturés. Ces données ont fourni une aide précieuse pour la compréhension des mécanismes de dégradation oxydante des terpènes. Nos études sur l'oxydation du squalène et de ses dérivés ont démontré la formation d'hydroperoxydes mais également des produits secondaires d'oxydations comme cela avait été reporté dans la littérature relative aux acides gras insaturés. De plus, l'identification des produits de décomposition a confirmé l'intervention des mêmes mécanismes de dégradation pour les terpénoïdes modèles que ceux rencontrés avec les acides gras insaturés.

Le **chapitre 2** était consacré à l'étude du squalène. Nous avons oxydé ce composé avec de l'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), produit par photooxydation ($h\nu/\text{sensibilisateur}/\text{O}_2$) ou par oxydation chimique par dismutation du peroxyde d'hydrogène catalysée par des ions molybdate MoO_4^{2-} . La « dark singlet oxygenation » permet mieux de contrôler le taux de peroxydation du squalène et assure une meilleure reproductibilité des expériences par rapport à la photooxydation.

Puis nous avons analysé la composition des solutions peroxydées obtenues en associant différentes techniques analytiques : la RMN, la spectrométrie de masse et la CLHP. Cependant, l'identification des hydroperoxydes formés au cours des processus photochimique et chimique s'est révélée délicate en raison de leur instabilité thermique. En outre, la présence des six doubles liaisons le long du squalène, entraîne la formation d'un nombre élevé d'isomères de position, complexifiant l'étude du mélange des peroxydes obtenus.

La RMN nous a permis d'avoir une vision globale de la structure des hydroperoxydes formés le long de la chaîne. Le squalène étant composé de 6 motifs identiques, il nous a été difficile d'identifier clairement la structure précise des hydroperoxydes de squalène. Cependant, les motifs des hydroperoxydes tertiaires et des hydroperoxydes secondaires, présentent des déplacements chimiques caractéristiques grâce auxquels nous avons pu les quantifier en proportions relatives.

Les problèmes posés par l'instabilité thermique des hydroperoxydes ont été contournés en recourant à la spectrométrie de masse associée à une technique d'ionisation par électronébullisation (*ESI-Qq-TOF*). Grâce à cette technique douce nous avons pu analyser les $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ formés, à 25°C. L'utilisation de lithium comme agent d'ionisation nous a permis de détecter six familles d'hydroperoxydes, notés $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ avec $n = 1$ à 6, résultant de la peroxydation successive des doubles liaisons du squalène. Que ce soit par photooxydation ou oxydation chimique, le milieu contient toujours un mélange d'hydroperoxydes d'au moins 3 degrés de peroxydation différents. Les analyses réalisées par spectrométrie de masse ont révélé des valeurs de m/z correspondant à des $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ où n est supérieur à 6 (jusqu'à 10). Néanmoins, nous avons pu démontrer que ces valeurs ne correspondent plus à des hydroperoxydes mais à des produits d'oxydation secondaires.

Nous avons utilisé la CLHP en phase inverse, afin de séparer les différentes familles de SQ(OOH)_n en se basant sur leur différence de polarité. De plus, chaque pic a été isolé et analysé par spectrométrie de masse ESI-MS, permettant d'en identifier la composition précise. Ainsi, nous avons confirmé que le pic présentant le temps de rétention le plus faible correspond au degré de peroxydation le plus élevé et ainsi de suite. Cette technique d'analyse, simple et rapide, nous a permis de suivre aisément l'oxydation du squalène en fonction du temps.

Dans la seconde partie de ce chapitre 2, nous avons dégradé thermiquement les hydroperoxydes de squalène et analysé les composés organiques volatils libérés. Deux techniques analytiques complémentaires ont été utilisées afin d'identifier les produits de décomposition. Les molécules volatiles ont été condensées dans du CDCl₃ refroidi à -8°C, puis nous avons analysé le mélange obtenu par RMN par une expérience COSY afin d'en déterminer la structure chimique. En complément, la spectrométrie de masse FT-ICR utilisant un analyseur B-trap pour l'analyse de traces de volatils, développée par la société Alyxan, a été employée. Ainsi, les COVs libérés de la décomposition des mélanges d'hydroperoxydes ont été identifiés et quantifiés en temps réel. Nous avons pu ainsi détecter jusqu'à 19 volatils différents dont 16 ont pu être identifiés en croisant les informations fournies par les mécanismes possibles avec celles obtenues par RMN. Nous avons ainsi montré que l'acétone est le composé majoritairement formé puisqu'il représente entre 23% et 80% des COVs émis en fonction du degré de peroxydation de l'échantillon analysé.

La démarche suivie pour l'étude du squalène a été transposée dans le **chapitre 3** pour l'étude des terpènes et terpénoïdes modèles. L'intérêt de l'étude de ces monoterpènes est de simplifier considérablement l'écriture des mécanismes de formation et de dégradation des hydroperoxydes. Le choix des terpènes, à savoir le 2,6-diméthyl-2-octène, 2,6-diméthyl-2,6-octadiène et 2,6,10-triméthyl-2,6,10-dodécatriène repose sur leur similitude avec certains motifs structuraux du squalène : pas de groupements fonctionnels et un, deux ou trois motifs structuraux isopréniques. Les acétates de citronellyle et de géranyle notamment, nous ont permis de quantifier précisément chaque motif hydroperoxyde formé grâce à la présence de protons caractéristiques en position α de l'ester. Nous avons vérifié que, comme attendu, la fonction polaire electro-attractrice de l'acétate réduit la réactivité de la double liaison en position β vis-à-vis de ¹O₂. Par ailleurs, comme pour le squalène, nous avons trouvé des quantités identiques d'hydroperoxydes secondaires et tertiaires, quelque soit le modèle étudié.

La réduction par la triphénylphosphine des hydroperoxydes, en alcool plus stables, a permis de les analyser par CG-FID. Cette étude a confirmé les proportions similaires des deux isomères de position dans le cas des substrats mono-instaurés. La comparaison de l'évolution des mono et des dihydroperoxydes, au cours du temps de photooxydation du 2,6-diméthyl-2,6-octadiène et de l'acétate

de géranyle, a conforté l'influence de la présence d'un groupement polaire sur la peroxydation d'un substrat. En effet, l'acétate de géranyle se peroxyde moins rapidement que le terpène dans des conditions identiques. L'étude par spectrométrie de masse *ESI-Qq-TOF* au lithium a été possible pour les hydroperoxydes des stéarates de citronellyle, de géranyle et de farnésyle, car ils présentent des masses molaires élevées. Le degré de peroxydation maximal correspond au nombre de doubles liaisons présentes dans la molécule.

Enfin, l'ensemble des hydroperoxydes des modèles ont été analysés, par un spectromètre de masse doté d'un analyseur B-trap, lors de séjours effectués à l'Université d'Orsay. La comparaison des résultats obtenus pour l'ensemble des modèles et les similitudes relevées ont permis d'identifier et de valider les COVs issus du motif de base identique à tous les terpènes et au squalène. Nous avons ainsi confirmé que l'acétone et la méthacroléine, composés majoritaires, résultaient d'une α et d'une β scission des hydroperoxydes tertiaires et secondaires. L'ensemble des volatils identifiés au cours de cette thèse sont regroupés figure 1, ceux en bleu sont communs à l'ensemble des substrats.

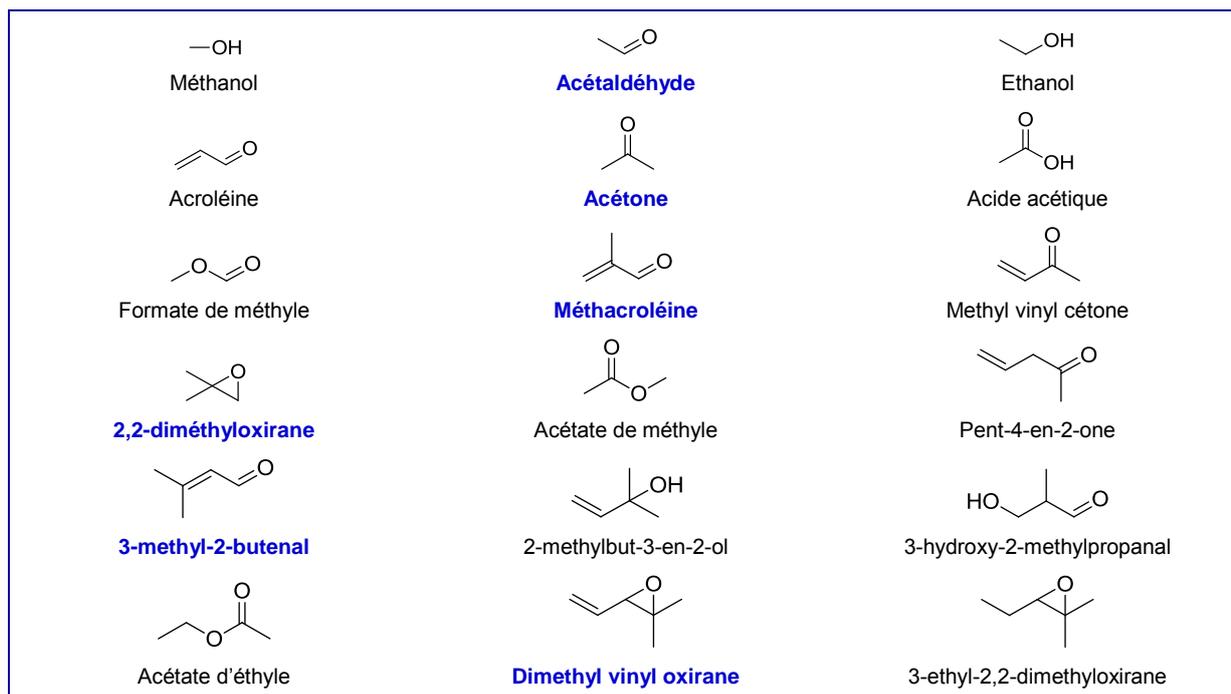


Figure 1 : Ensemble des molécules organiques volatiles identifiés lors de la dégradation des hydroperoxydes des terpènes et terpénoïdes « modèles ». Les noms des molécules en bleu sont communs avec ceux issus de la décomposition des hydroperoxydes de squalène.

La figure 2 ne présente que les composés organiques volatils propres à la thermolyse des hydroperoxydes de squalène.



Figure 2 : Composés organiques volatils propres à la décomposition des $SQ(OOH)_n$ ($n > 4$).

L'étude approfondie des volatils issus de la dégradation des hydroperoxydes, permet de conclure que de même que pour le cas des acides gras insaturés, la décomposition thermique des hydroperoxydes de squalène résulte d'un mécanisme en deux étapes : **1**) formation des radicaux alcoxyles RO^\bullet et **2**) α et β -scission des radicaux produisant des aldéhydes, des alcools et des cétones. La formation d'oxirane résulte par ailleurs d'une cyclisation du radical alcoxy.

Enfin, dans le **chapitre 4** nous avons exploré deux autres initiateurs de décomposition des hydroperoxydes : les complexes ferreux à base d'un ligand pentadenté ainsi que les enzymes de type hydroperoxyde-lyases. Les catalyseurs $L_{5N}Fe^{II}$ sont utilisés dans les produits lessiviels comme agent de blanchiment. En présence d'oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène atmosphérique ou les hydroperoxydes, ils décolorent les tâches hydrophobes. Leur réactivité en présence de peroxyde ayant été de nombreuses fois démontrée, nous avons évalué leur efficacité en présence des $SQ(OOH)_n$. En comparant deux complexes de type $L_{5N}Fe^{II}$, le Fe-MeN₄Py et le Fe-bispidone, dans 5 solvants organiques (l'acétone, l'acétonitrile, le chloroforme, l'éthanol et le méthanol), nous avons pu mettre en avant l'influence du ligand mais également celle du milieu réactionnel.

L'association de la spectrométrie UV et de la titration en retour à l'iode des peroxydes présents dans le milieu, nous a permis d'avoir une image complète des réactions opérants dans les systèmes $L_{5N}Fe^{II}/SQ(OOH)_6$. Ainsi, l'activité catalytique des complexes ferreux repose sur un cycle catalytique en plusieurs étapes représenté schéma 2.

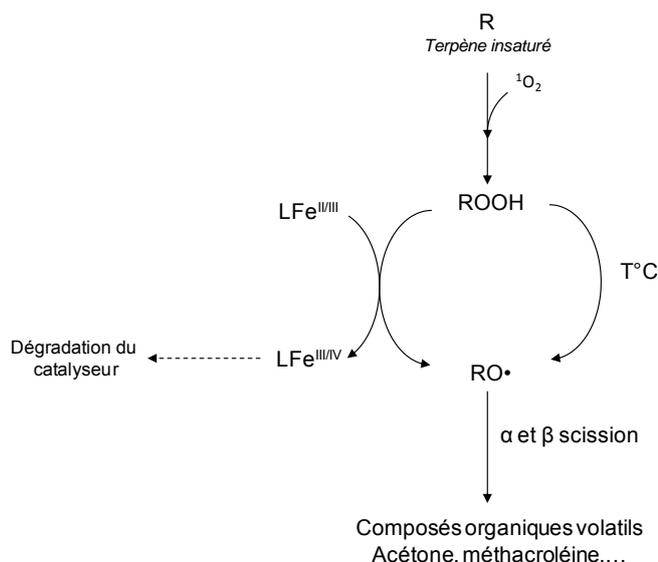


Schéma 3 : Schématisation des différents mécanismes de l'oxydation des terpènes et de dégradation de leurs hydroperoxydes.

Ce travail a montré d'une part la facilité d'oxydation des substrats terpéniques avec des doubles liaisons trisubstituées tels que le squalène, mais également la complexité des mélanges d'hydroperoxydes isomères résultants. Il a également permis de mettre en avant que ces produits primaires d'oxydations se dégradent en formant de nombreux composés organiques ; l'acétone et la méthacroléine étant largement majoritaires. Il faut noter que l'ensemble des expériences ont été menées dans des environnements organiques, la transposition des protocoles expérimentaux dans des conditions de détergences standards reste encore à être réalisée. En effet dans ces conditions d'autres facteurs seront alors susceptibles d'interagir dans les mécanismes impliqués tels que le tissu ou le pH.

Par ailleurs, les systèmes $L_{5N}Fe^{II}/SQ(OOH)_6$ se sont révélés très réactifs. L'utilisation de complexes ferreux tels que Fe-MeN₄Py ou Fe-bispidone permet de dégrader les hydroperoxydes de squalène, libérant les mêmes COVs que lors de la thermolyse, mais à température ambiante. Outre leur capacité à convertir le squalène en précurseur de parfum, ces complexes ferreux, initialement conçus pour servir d'agent de blanchiment, catalyse la dégradation des hydroperoxydes et peuvent ainsi réduire les problèmes d'allergies ou d'irritation cutanée provoquée par les SQ(OOH)s présents sur le cuir chevelu.

Le sébum, principale source de salissures grasses sur les textiles, est un mélange complexe contenant 12% de *squalène*, triterpène présentant 6 doubles liaisons facilement oxydables. Son oxydation par l'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$, conduit à la formation d'hydroperoxydes dont la décomposition libère une odeur agréable. L'objectif de l'étude était d'élucider les mécanismes mis en jeu lors de cette dégradation oxydante. Le squalène a donc été oxydé par $^1\text{O}_2$, engendré *photochimiquement* et *chimiquement* par un système $\text{MoO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{O}_2$. La CLHP couplée à la *spectrométrie de masse* utilisant une technique d'ionisation par *électronébullition* au *lithium*, a permis de détecter six familles d'hydroperoxydes, notés $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ avec $n = 1$ à 6. La RMN a montré que les hydroperoxydes secondaires et tertiaires se forment en proportions équivalentes. Puis, la dégradation thermique des hydroperoxydes de squalène a été étudiée en recourant à la RMN et à la *spectrométrie de masse B-trap*. 9 volatils ont été identifiés, l'acétone étant le composé majoritairement formé (de 23 à 80%). La décomposition thermique des hydroperoxydes de squalène résulte d'un mécanisme en deux étapes : formation des radicaux alcoyles RO^\bullet et peroxydes ROO^\bullet suivi des α et β -scissions produisant des *aldéhydes*, des *alcools* et des *cétones*. Enfin, l'activité catalytique de deux complexes ferreux à base de ligands pentadentés, le Fe-MeN₄Py et Fe-bispidone, a été évaluée sur la dégradation des $\text{SQ}(\text{OOH})_6$. Les mêmes volatils que ceux générés par voie thermique sont alors formés mais à température ambiante, ouvrant des perspectives quant à l'exaltation de la dégradation des hydroperoxydes de squalène lors de la détergence.

Mots clés : *Squalène, terpènes, terpénoïdes, dégradation oxydante, peroxydation, oxygène singulet, hydroperoxyde, volatils, RMN, spectrométrie de masse ESI-Qq-TOF, dopage au lithium, spectrométrie de masse FT-ICR, analyseur B-trap, catalyseurs ferreux, ligand pentadenté*

The main source of fatty soils on fabrics is the human sebum including 12% of squalene, a triterpene easily oxidizable due to the presence of six unsaturations. Its oxidation by singlet oxygen, $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), leads to hydroperoxide formation whose decomposition releases a pleasant odour. The aim of this study was to clarify involved mechanisms of oxidative degradation of squalene. First, Squalene has been oxidized by singlet oxygen from photochemical and chemical way by decomposition of hydrogen peroxyde catalyzed by molybdate ions. Despite the complexity and the medium and the intrinsic fragility of performed hydroperoxides, HPLC coupled with ESI-MS-Li⁺, has detected six hydroperoxide families, written $\text{SQ}(\text{OOH})_n$ with $n = 1$ to 6. NMR has been shown that secondary and tertiary hydroperoxides are performed in equal quantity. Then, thermal degradation of squalene hydroperoxide according their peroxidation degree has been study by B-trap mass spectrometry. 9 volatiles have been detected and identified including acetone as major compounds (23 to 80%). The thermal degradation of squalene hydroperoxide results from two-step mechanism: alkoxy radical formation RO^\bullet and peroxy radicals ROO^\bullet followed by α and β scissions releasing aldehydes, alcohols and ketones. Finally, catalytic activity of two ferrous complexes has been evaluated on squalene hexahydroperoxide degradation. The same volatiles as those detected by thermolysis have been released, catalyzed by bleaching agent, with the same kinetic as at 80°C but at room temperature. The use of ferrous complexes opens prospects about exaltation of squalene hydroperoxide degradation during detergency.

Key words : *Squalene, terpenes, terpenoids, oxydative degradation, peroxidation, singlet oxygen, hydroperoxide, volatiles, NMR, mass spectrometry ESI-Qq-TOF, lithium, mass spectrometry FT-ICR, analyzer B-trap, ferrous catalyst, pentadentate ligand*