

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



**Université Abderrahmane Mira- Bejaia**

**Faculté de Technologie**

**Département de Génie des Procédés**



# Mémoire de fin de cycle

**En vue de l'obtention du diplôme de master**

**Filière : Génie des Procédés**

**Spécialité : Génie Alimentaire**

## *Thème*

***Réactivité chimique des anthocyanes en vue de leur application en sciences alimentaires***

**Réalisé et présenté par:**

**M<sup>elle</sup> : OUARET Lynda**

**M<sup>elle</sup> : OUGUERGOUZ Hanane**

**Membres de jury :**

**Promoteur : M<sup>elle</sup> S.ACHAT**

**Co-Promoteur : M<sup>elle</sup> S.IDIR**

**Président: M<sup>me</sup> N. CHIBANI**

**Examineur: Mr K.BELHAMEL**

**2019 - 2020**

# **Remerciement**

*Au terme de ce modeste travail, nous tenons tout d'abord à remercier le « Bon dieu » le tout puissant de nous avoir accordé le courage, la patience et surtout la santé pour réaliser ce travail.*

*Nous avons l'honneur et le plaisir d'exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à M<sup>elle</sup> ACHAT, S., notre promotrice et M<sup>elle</sup> IDIR, S., notre Co-promotrice pour leurs précieuses aides, leurs orientations et le temps qu'elles nous ont accordé pour notre encadrement.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent également aux membres du jury de nous avoir fait l'honneur d'examiner notre travail.*

*Dans le souci de n'oublier personne, on remercie vivement tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de nos études. Qu'ils puissent trouver ici l'expression de notre reconnaissance.*

# **Dédicaces**

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A la mémoire de mon père que dieu l'accueille dans son vaste  
paradis ;*

*A celle qui m'a soutenu et m'a encouragé durant toute ma vie et  
donné l'espoir de poursuivre ce chemin jusqu'au bout ma chère mère  
que dieu la protège ;*

*A mes chers frères ;*

*A mes chères sœurs ;*

*A toute ma famille, et mes adorables amies ;*

*A ma binôme Lynda et toute sa famille ;*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet  
soit possible, je vous dis merci.*

**HANANE**

# *Dédicaces*

*Au nom du tout puissant je dédie ce modeste travail Aux deux êtres les plus chers au monde, mes parents qui n'ont pas cessé de m'encourager en me prodiguant de précieux conseils, c'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection.*

*A mon cher frère*

*A ma chère sœur*

*A tous mes cher(es) ami(es)*

*A ma binôme Hanane et toute sa famille*

**LYNDA**



# *Sommaire*

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction .....	1
I. Généralités .....	3
I.1. Définition .....	3
I.2. Structure .....	4
I.3. Source alimentaire des anthocyanes.....	5
I.4. Activité antioxydante .....	7
I.5. Autres activités biologiques .....	7
II. Extraction des anthocyanes.....	9
II .1. Extraction par solvant.....	9
II.2. Extraction par ultrasons.....	11
II.3. Extraction par microondes.....	14
II.4. Extraction par fluide supercritique.....	17
III. Détermination des anthocyanes.....	19
III.1. Méthodes spectrales.....	19
III.1.1. U-V visible .....	19
III.1.2. pH différentielle.....	19

---

III.1.3. Spectrométrie de masse (MS).....	20
III.2. Méthodes chromatographiques .....	21
III.2.1. HPLC.....	21
III.2.1. HPLC-MS.....	21
III.2.2. HPLC-DAD .....	22
III.2.3. HPLC-DAD-MS .....	22
IV. Réactivité des anthocyanes et facteur influençant leur stabilité.....	24
IV.1. Effet du pH .....	24
IV.2. Effet de la température .....	28
IV.3. Structure des anthocyanes .....	30
IV.4. Copigmentation, auto-association et complexation métallique.....	30
IV.5. Dégradation des anthocyanes .....	35
IV.5.1. Oxydation enzymatique.....	35
IV.5.2. Oxydation chimique.....	36
V. Encapsulation.....	39
V.1. Définition .....	39



V.2. Encapsulation des anthocyanes pour les applications alimentaires.....41

Conclusion.....44



$\varepsilon$  : coefficient d'extinction molaire

$\lambda$  max : longueur d'onde maximale.

$\mu\text{g/g}$  : microgramme par gramme.

$\pi$  : pi.

APCI : l'ionisation chimique à pression atmosphérique.

Ar : anneau catéchol.

C : concentration de solution.

CD : dichroïsme circulaire.

CG : l'acide chlorogénique.

CGQ : chlorogénoquinone.

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone.

CPG : chromatographie en phase gazeuse.

Cy: Cyanidine.

DAD : Détecteur à barrette de diodes.

Del: delphinidine.

ESL : extraction solide-liquide.

ESI : l'ionisation par jet d'électrons

GHz : gigahertz.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène.

HCA : Les acides hydroxycinnamiques.

HCL : acide chlorhydrique.

HPLC : chromatographie liquide haute performance.

KHZ : Kilohertz.

M : masse molaire.

Ma: Malvidine.

MAE : extraction assistée par microondes.

Min : minute.

mg DGE/100 g DP : delphinidin-3-glucoside équivalent par 100 g de la poudre sèche.

MPa : mégapascal.

MS : Spectrométrie de masse.

P : pascal.

Pg: pélargonidine.

pH : potentiel hydrogène.

Pn: péonidine.

PPO : Les polyphénoloxydase.

Pt: pétunidine.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

SFE : extraction par fluide supercritique.

T : température.

t : temps.

TMA : teneur monomérique en anthocyanes.

UAE : extraction assistée par ultrason.

US : Ultrason.

UV : Ultra-Violet.

vis : visible.

W/W : Weight/weight.



*Liste des figures*

<b>Figure</b>	<b>Titre de la figure</b>	<b>page</b>
<b>1</b>	Structure de base des flavonoïdes.	<b>3</b>
<b>2</b>	Structure des six principales anthocyanidines rencontrées chez les végétaux avec leur abondance relative. La structure de base du cation flavylum est indiqué en rouge.	<b>4</b>
<b>3</b>	Effondrement de bulles de cavitation et libération de matériel végétal.	<b>12</b>
<b>4</b>	Représentation de spectre électromagnétique et positionnement des microondes domestiques.	<b>15</b>
<b>5</b>	Transformations structurales des anthocyanes en solution aqueuse acide.	<b>25</b>
<b>6</b>	Structure de la méthylpyranoflavylum.	<b>26</b>
<b>7</b>	Réactivité de la méthylpyranoflavylum dans l'eau à différentes valeurs de pH.	<b>26</b>
<b>8</b>	Répartition de la fraction molaire du cation flavylum et des bases quinoïdales du pyranomalvidine-3-O coumaroylglucoside- (+) -catéchine.	<b>27</b>
<b>9</b>	Distribution des différentes formes en équilibre du malvidin-3-Oglucoside-catéchine glucoside selon le pH.	<b>28</b>
<b>10</b>	Mécanisme proposé de la dégradation thermique de deux anthocyanes communes.	<b>29</b>
<b>11</b>	Structure chimique de quelques copigments.	<b>31</b>
<b>12</b>	Les différentes interactions possibles des anthocyanes.	<b>32</b>
<b>13</b>	Changement de couleur de la solution P6 a ph =7 et 50°C après addition du Fe <sup>2+</sup> pendant 24h (concentration en pigment= 50 µM).	<b>34</b>
<b>14</b>	Mécanisme d'oxydation des polyphénols par la polyphénol oxydase.	<b>35</b>
<b>15</b>	Voies de dégradation des anthocyanes.	<b>36</b>
<b>16</b>	Mécanisme proposé pour la dégradation des anthocyanes avec la préformation du peroxyde d'hydrogène.	<b>37</b>
<b>17</b>	Dégradation des anthocyanes proposés sans la préformation du peroxyde d'hydrogène.	<b>38</b>
<b>18</b>	Oxydation des polyphénols : formation de quinone catalysée par des ions métalliques.	<b>38</b>

*Liste des tableaux*

<b>Tableau</b>	<b>Titre du tableau</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Composition de quelques végétaux riches en anthocyanes.	<b>6</b>
<b>II</b>	Propriétés biologiques associées aux anthocyanines.	<b>8</b>
<b>III</b>	Extraction par solvants des anthocyanes de quelques végétaux.	<b>10</b>
<b>IV</b>	Extraction par ultrason des anthocyanes de quelques végétaux.	<b>13</b>
<b>V</b>	Extraction par microonde des anthocyanes de quelques végétaux.	<b>16</b>
<b>VI</b>	Principaux procédés de microencapsulation utilisés en sciences des aliments.	<b>40</b>
<b>VII</b>	Encapsulation d'anthocyane par certains matériaux et techniques.	<b>42</b>

# *Introduction*



## Introduction

Aujourd'hui, avec la prise de conscience croissante des consommateurs quant à la nécessité d'apporter des habitudes alimentaires saines, l'industrie s'est efforcée de trouver des sources alternatives, naturelles, d'additifs qui peuvent également apporter certains avantages pour la santé (**Silva et al., 2015**).

Le remplacement des colorants synthétiques par des colorants naturels est devenu un enjeu majeur au cours des dernières années. Les pigments de sources naturelles peuvent afficher un large éventail de couleurs tel est le cas des anthocyanes ont un rôle crucial lorsqu'il s'agit de colorant naturels (**He et Giusti, 2010**).

Les anthocyanes sont des composés bioactifs présent dans de nombreux fruits, légumes et leurs produits. Ils sont responsables d'une large gamme de couleurs présentes dans les pétales des fleurs, feuilles, fruits et légumes et comprennent un groupe important de flavonoïdes (**Patras et al., 2010**).

De plus, des données de plus en plus nombreuses suggèrent que les aliments riches en anthocyanes offrent une protection contre les maladies cardiovasculaires, certains cancers et certaines autres maladies chroniques (**Hou, 2003 ; Lila, 2004**). Les rôles bénéfiques des anthocyanes pour la santé ont été le plus souvent associés à leur activité antioxydante élevée.

Bien que les anthocyanes sont des agents colorants précieux pour l'industrie alimentaire (**Yuan, 2009**). Néanmoins leur utilisation a été limitée en raison de leur faible pourcentage d'extraction et de leur relative instabilité vis-à-vis des facteurs physiques et chimiques prévalant lors des traitements de transformation ou de stockage (**Cavalcanti et al., 2011**).

Une procédure d'extraction efficace devrait maximiser la récupération de l'anthocyane avec une dégradation ou une altération minimale de son état naturel. L'extraction solide-liquide (ESL) est l'approche classique utilisée pour récupérer les anthocyanes des tissus végétaux car leur polarité facilite la dissolution dans les solvants polaires, par exemple de méthanol acidifié et l'acétone (**wallace et Giusti, 2013**).

Avec l'augmentation de la demande de ces composés, de nouvelles approches technologiquement avancées sont mises en œuvre pour mieux extraire les anthocyanes, certaines de ces technologies émergentes, comprennent l'extraction par fluides supercritiques, l'extraction assistée par microondes et l'extraction assistée par ultrasons (**Galvan D'Alessandro et al., 2014**).

Une fois l'extraction est réalisée, les pigments naturels doivent être stabilisés et dispersés dans la perspective d'une application agroalimentaire et pharmaceutique. L'encapsulation, une technique très utilisée pour protéger et moduler les fonctionnalités des molécules fragiles, est la réponse pour ces besoins. Dans la dernière décennie, elle a été largement étudiée et utilisée dans de nombreuses applications dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire.

A fin de cerner au mieux le contexte dont lequel s'inscrit notre travail ; nous avons évoqué les généralités sur les anthocyanes, puis une synthèse de différents travaux portant sur l'extraction, la détermination et la réactivité des anthocyanes et pour terminer avec l'encapsulation de ces molécules bioactives.

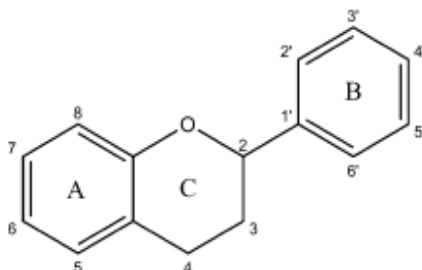
*Généralités sur les  
anthocyanes*

## I. Généralités sur les anthocyanes

### I.1. Définition

Le terme anthocyane dérive des mots grecs *anthos* (fleur) et *cyanus* (bleu), sont des pigments importants des plantes vasculaires capables d'absorber la lumière visible, Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu (**Kong et al., 2003**). Ces pigments sont responsables des colorations oranges, roses, rouges, violettes et bleues brillantes des fleurs et des fruits de nombreuses plantes (**Turker et al., 2004 ; Valls et al., 2009**).

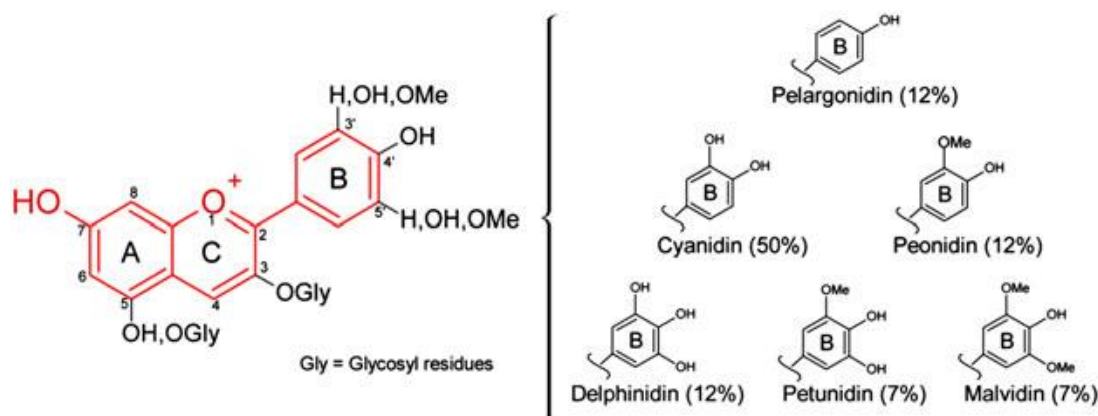
Les anthocyanes appartiennent à une classe très répandue des composés phénoliques appelés flavonoïdes (**Smeriglio et al., 2016**) (**figure 01**). Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6. Les principaux substituants de ce squelette de base sont les groupements hydroxyle, méthoxyle et O- $\beta$ -D-glucosyle (**De Pascual-Teresa et al., 2010; Routray et Orsat, 2019**).



**Figure 01** : Structure de base des flavonoïdes (**Valls et al., 2009**).

### I.2. Structure chimique

Dans une anthocyane, la partie responsable de la couleur (chromophore) s'appelle l'anthocyanidine, qui est l'aglycone, et présente une structure de cation flavylum ou 2-phényl 1-benzopyrilium (**figure 02**) (**Silva et al., 2016**).



**Figure 02 :** Structure des six principales anthocyanidines rencontrées chez les végétaux avec leur abondance relative. La structure de base du cation flavylum est indiquée en rouge (**Silva et al., 2016**).

Dans les anthocyanes naturels, le groupement OH en position 3 est toujours glycosylé et celui en position 5 l'est très fréquemment. Les anthocyanes se distinguent par, la nature des sucres impliqués dans leurs structures le plus fréquemment des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose) et des di- et tri-saccharides formés par la combinaison des monosaccharides précédents qui, eux-mêmes, peuvent être acylés par des acides carboxyliques aromatiques (acide benzoïque et acide cinnamique diversement hydroxylés), mais aussi par la nature de l'anthocyanidine qui peut présenter différents substituants sur les positions 3' et 5' (**Wrolstad, 2006**).

Les anthocyanes sont des glycosides d'environ 23 anthocyanidines naturelles différentes dont les plus courantes sont : la delphinidine, la cyanidine, la pétunidine, la péonidine et la malvidine (**figure 02**) (**Castañeda-Ovando et al., 2009 ; Prior et Wu, 2012**).

### I.3. Sources alimentaires des anthocyanes

Les principales sources d'anthocyanes dans l'alimentation humaine sont les fruits et les légumes, à savoir les baies (bleuets, fraises, mûres, canneberges, framboise et autres), ainsi que les raisins à peau rouge, les pommes et les poires et d'autres légumes à pigmentation pourpre/rouge comme les carottes, pommes de terre, radis et choux pour n'en nommer que quelques-uns. Il existe quelques exceptions, dont les tomates rouges, pigmentées par le lycopène, et les betteraves, pigmentées par les bétalaines (**Burton-Freeman et al., 2016**).

La composition anthocyanique des aliments dépend du cultivar/variété, de la maturité, des pratiques de culture, de la superficie cultivée, de la saison/climat, de la transformation et de l'entreposage (**Rodriguez-Amaya, 2019**). **Amarowicz et al., (2009)** ont examiné en profondeur l'influence du traitement et de l'entreposage après la récolte sur le contenu des flavonoïdes (y compris les anthocyanes), concluant que l'effet du stockage et de la transformation sur la teneur en polyphénol est négligeable par rapport aux différences entre les différentes variétés de plantes.

En plus des fruits et légumes, les anthocyanes sont livrés par l'alimentation comme colorants naturels (aliments et boissons) (**Burton-Freeman et al., 2016**). Les colorants alimentaires naturels à base d'anthocyanes sont extraits pour l'essentiel des résidus de l'industrie de vinification qui doivent être éliminés dans le respect de la réglementation environnementale européenne. Ce sont des résidus solides (marcs de raisin) constitués des pellicules, des pépins, de rafles, de pulpe et des lies de vin (résidus liquides qui se déposent dans le fond des cuves de fermentation) (**Beye et al., 2015**).

Les anthocyanes prédominants dans les fruits et légumes sont : cyanidine-3-O-glucoside, delphinidine-3-O-glucoside, malvidine-3-O-glucoside, pelargonidine-3-O-glucoside, and petunidine-3-O-glucoside (**Patras et al., 2010**).

Environ 700 anthocyanes structurellement différents ont été identifiées dans la nature et le nombre augmente constamment (**Gowd,V et al., 2017**). **Le tableau I** présente la composition de quelques végétaux riches en anthocyanes.

**Tableau I :** Composition de quelques végétaux riches en anthocyanes.

Source	Anthocyanes principales	Références
Framboise <i>Rubus idaeus</i> <i>Rubus occidentalis</i>	Cyanidin-3-O-sophoroside. Cyanidin-3-O- (2G-O-glucosyl) rutinoside. Cyanidin-3-O-glucoside. Cyanidin-3-O-rutinoside.	(Li et al., 2014 ; Teng et al., 2017).
Mûre <i>Morus alba L.</i>	Cyanidin-3-glucoside chloride Cyanidin-3-rutinoside chloride Pelargonidin-3-glucoside	(Lee et al., 2014 ; F. Yan et Zheng, 2017).
Riz noir <i>Oryza sativa L.</i>	Cyanidine-3-O-glucoside Peonidine-3-O-glucoside chloride	(Chiang et al., 2006 ; Walter et al., 2013).
Raisin <i>Vitis vinifera L.</i>	Malvidine-3-O-glucoside Pétunidine-3-O-glucoside Cyanidine-3-O-glucoside Delphinidine-3-O-glucoside paeonidine-3-O-glucoside	(Karthikeyan et al., 2007; Leong et al., 2016).
Myrtille <i>Vaccinium angustifolium</i>	Peonidine-3-glucoside Malvidin-3-galactoside Delphinidine-3-glucoside Delphinidin-3-galactoside	(Liang et al., 2013 ; Riso et al., 2013).
Hibiscus <i>Hibiscus sabdariffa</i>	Delphinidin 3-sambubioside Cyanidin 3-sambubioside Cyanidin 3-glucoside Delphinidin 3-glucoside	(Ojeda et al., 2010 ; Patel, 2014 ; Wu et al., 2016).

### I.3. Activités biologiques des anthocyanes

#### I.3.1. Activité antioxydante

Les composés qui sont les plus faciles à oxyder sont souvent les meilleurs antioxydants (molécules qui peuvent donner un électron libre ou des atomes d'hydrogène à des radicaux libres réactifs). Les anthocyanes ont une activité antioxydante grâce à leurs aglycones. Comme tous les polyphénols, elles possèdent des groupes hydroxyles phénoliques pouvant fournir aux radicaux libres des H capables de les neutraliser. Plusieurs études ont suggéré que le contenu anthocyanique et leur activité antioxydante correspondante contribuent aux effets protecteurs des fruits et des légumes contre les maladies dégénératives et chroniques (Ngyyen, 2018).

**Rahman et al., (2006)** ont étudié les activités antioxydante de 15 composées anthocyaniques extraits de la myrtille individuellement, démontrant l'activité antioxydante potentielle envers le radicale superoxyde dans l'ordre suivant : Delphinidine>Petunidine>Mavidine~Cyanidine>Peonidine>Pelargonidine. En outre l'anthocyanidine glycosylée avait un effet de piégeage faible comparé à l'aglycone correspondant (**Rahman et al., 2006**).

#### I.3.2. Autres activités biologiques

Des études ont montré que les anthocyanes possèdent en plus de l'activité antioxydante autres activités biologique. Le **tableau II** résume certaines de ces activités.

Les preuves des propriétés anticancéreuses des anthocyanes provenant de multiple source de fruits, basé sur des études *in vivo* sont solides (**Olivia et al., 2020**). Par exemples, des extraits riches en anthocyanes de myrtille, l'aronia et de raisin, administrés à des rats exposés à un agent cancérigène (azoxyméthane) pendant 14 semaines, ont montré une réduction de la prolifération cellulaire du colon ainsi qu'une baisse d'expression de gène COX-2 (partie de l'ADN responsable de développement d'un cancer du côlon) (**Iala et al., 2006**).



**Tableau II** : Quelques propriétés biologiques associées aux anthocyanes.

<b>Source</b>	<b>Activité biologique</b>	<b>Références</b>
Framboise <i>Rubus idaeus</i> <i>Rubus occidentalis</i>	Anti-inflammatoire	(Li et al., 2014 ; Teng et al., 2017)
Raisin <i>Vitis vinifera L.</i>	Cardioprotecteur	(Karthikeyan et al., 2007 ; Leong et al., 2016).
Arbousier <i>Arbutus unedo L.</i>	Propriétés anti-tumorales	(Guimarães et al., 2014)
Cerisier, myrtille et sureau	Réduction des facteurs de risque et la prévention des problèmes cardiovasculaire	(De Pascual-Teresa et al., 2010)

*Extraction des  
anthocyanes*

## II. Extraction des anthocyanes, principe et limite

Il n'existe pas de méthode d'extraction standard unique. En fait, la majorité des études publiées font état de l'utilisation de différentes techniques d'extraction appliquées dans diverses conditions pour comprendre la sélection de méthodes d'extraction à partir de diverses sources naturelles (Azmir *et al.*, 2013).

Le but d'Extraction par solvant, microonde et ultrason est d'avoir un meilleur rendement, meilleure qualité de l'extrait avec réduction du temps d'extraction (Tiên DO, 2016).

### II.1. Extraction par solvant

L'isolement des principes actifs en général (composés phénoliques, colorants...) à partir des cellules est réalisé en faisant appel à l'extraction solide-liquide. Parmi les nombreuses techniques d'extraction, l'extraction par solvant est la méthode la plus ancienne et, également, la plus utilisée (Eldarra, 2013). Elle est réalisée, en principe, par contact d'un solide (le végétal) avec un liquide et la séparation grâce au liquide d'un ou plusieurs composés solubles, « les solutés », contenus dans un matériau solide insoluble. Le liquide d'extraction est appelé «solvant » (Silva *et al.*, 2017).

Bien qu' hydrosolubles , les anthocyanes sont extraites par une combinaison de méthanol ou d'éthanol dans l'eau pour améliorer l'efficacité d'extraction et stabiliser les composés cibles (Abdel-Aal *et al.*, 2018; Hong *et al.*, 2020). Les solutions acidifiées sont couramment utilisées pour extraire les composés d'anthocyanes en raison du fait que le cation flavylum est stable à pH faible (Brooks et Celli, 2019). Des acides faibles peu corrosifs, tels que des acides organiques à des concentrations qui permettent d'éviter l'hydrolyse des groupements acyle (acide malique et acide tartrique) à 1.25% (Todaro *et al.*, 2009), des solutions acidifiées avec différents acides : 0.2% d'acide formique (Boulekbache-Makhlouf *et al.*, 2013), L'acide phosphorique (jusqu'à 5%) (Trikas *et al.*, 2016), ont été rapportés comme des solutions d'extraction efficaces pour les anthocyanes.

La procédure la plus commune pour extraire les anthocyanes utilise des solvants tels que le méthanol ou l'éthanol avec différentes proportions d'acide chlorhydrique (HCl 0.1-1%) (Hong *et al.*, 2020).

Les différents solvants et les conditions d'extraction de quelques matrices végétales sont résumés dans le tableau ci-après :

**Tableau III** : Extraction par solvants des anthocyanes de quelques végétaux.

Matrice	Solvants et condition d'extraction	Teneur en anthocyanes	Référence
Pelure d'aubergine	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 70% de méthanol,</li> <li>✓ 70% d'éthanol</li> <li>✓ 70% d'acétone</li> </ul> Contenant 0.2% d'acide formique.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 82.83±1.07</li> <li>✓ 62.92±0.15</li> <li>✓ 51.56±4.87</li> </ul> (mg DGE/100 g DP)	(Boulekbache-Makhlouf et al., 2013)
Choux rouge	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'eau acidifiée (HCL : 0% - 4%)</li> <li>• Mélange éthanol et eau (20%-80%)</li> <li>• Mélange éthanol et eau acidifié : (20% - 80%) avec 1% HCL</li> <li>• Méthanol acidifié (0.1% et 1% HCL, 3% acide formique)</li> <li>• Mélange méthanol, acide formique, eau (50% + 5% + 45%)</li> <li>• Méthanol, acide acétique, eau (50% + 1% + 49%)</li> <li>• Solution d'acétone 70%</li> <li>• Solution d'acétone et acide formique 3%</li> </ul>	La solution acétone 70% a donné le meilleur rendement (425.9 mg/L) suivi par le méthanol acidifié 1% HCL (419.7 mg/L)  Le mélange éthanol/eau acidifié (HCL : 1%), 50% (v/v) a donné un rendement de 390,6 mg/l	(Chandrasekhar et al., 2012)
Radis rouge	Méthanol acidifié (0.01/100ml). Température : 25+1°C. Temps : 20 min. Trois cultivars de radis ont été utilisés pour l'extraction : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Yan zhi.</li> <li>• Tou Xin Hong(TXH).</li> <li>• Xin Ling Mei (XLM).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 160.74+8.83 mg/100g de racine.</li> <li>• 144.56+4.76m /100g de racine.</li> <li>• 63.77+ 1.21mg /100g de racine</li> </ul>	(Jing et al., 2012).
Pelure d'aubergine	Différents essais ont été réalisé pour chaque paramètre : solvant/ concentration en acide/ température/temps d'extraction/ratio solvant-solide : <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Ethanol acidifié</li> <li>✓ Solution d'acide tartrique</li> <li>✓ Solution d'acide malique</li> </ul>	(Concentration en acide organique 1.25% température 40° C ; temps d'extraction 60–80 min ; ratio solvant-solide 10 :1).  <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 76.44 ± 3.82</li> <li>✓ 69.40 ± 3.47</li> <li>✓ 65.79 ± 3.26</li> </ul> (mg/100 g de pelure)	(Todaro et al., 2009)

DGE : delphinidin-3-glucoside équivalent.

Pour la majorité des travaux réalisés le méthanol c'est avéré le solvant qui permettait d'obtenir le rendement le plus élevé mais en raison de sa toxicité son utilisation n'est pas recommandé (**Brooks et Celli, 2019**). L'utilisation d'un solvant organique a l'avantage d'inactiver les enzymes présentes dans les tissus végétaux et de faciliter le traitement subséquent de l'extrait obtenu, car il est facilement évaporé. Néanmoins, dépendant de la nature de l'échantillon, il peut s'avérer nécessaire d'ajouter de l'eau afin de réaliser une extraction complète des anthocyanes. L'éthanol est moins toxique, bien qu'il soit moins efficace dans l'extraction et plus difficile à éliminer plus tard. Des réactions d'estérification des groupements carboxyliques libres peuvent avoir lieu en présence d'éthanol, si le processus d'extraction est réalisé à haute température (**Emile, 2010**).

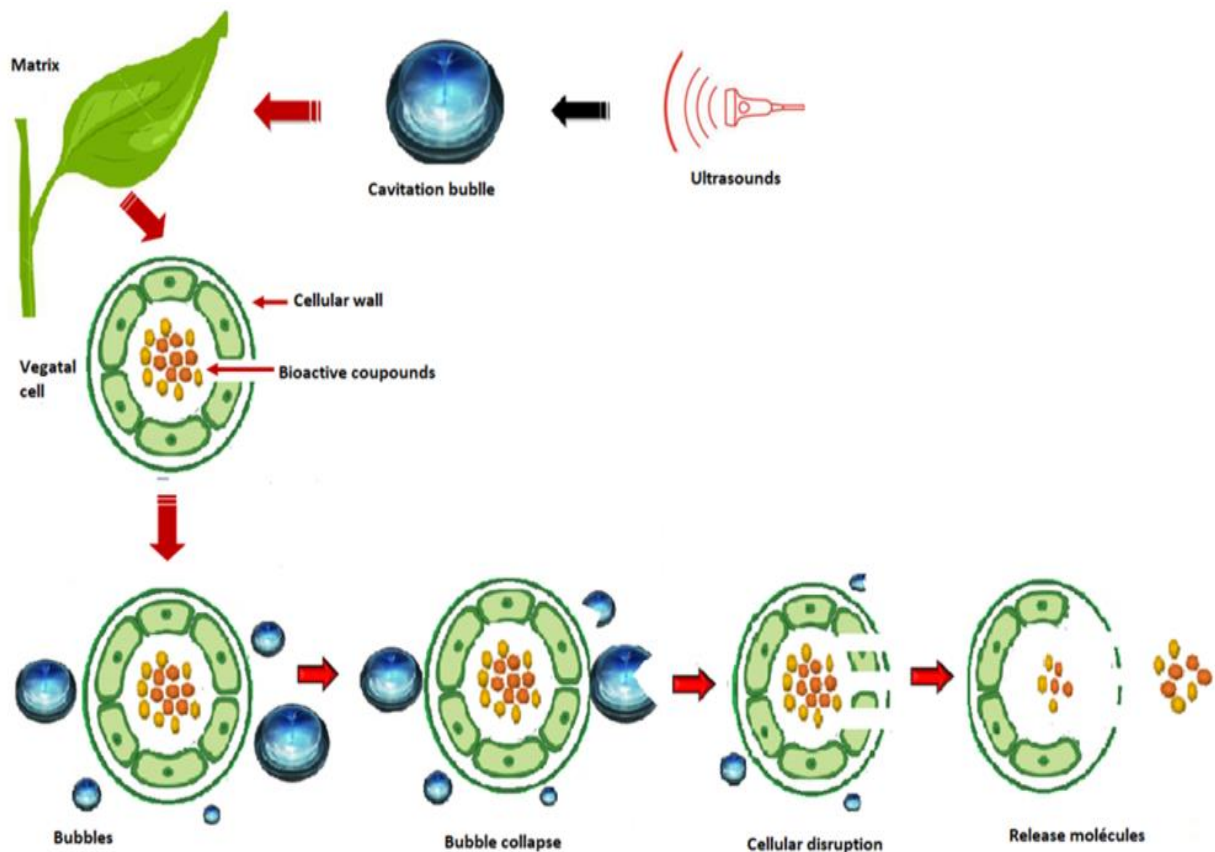
La température est une variable importante à contrôler lors de l'extraction par solvant. Des températures élevées sont fréquemment utilisées pour améliorer l'efficacité de l'extraction en provoquant des modifications structurelles de la matrice végétale. La température intervient en réduisant les propriétés diélectriques, la viscosité et la tension superficielle du solvant, ce qui entraîne une diffusion accrue des anthocyanes et une pénétration du solvant augmentant ainsi la solubilité des anthocyanes et améliorant leur vitesse de diffusion dans le solvant d'extraction, de plus le traitement thermique peut être bénéfique pour l'inactivation des enzymes dégradants les anthocyanes. Les anthocyanes non acylés sont plus sensibles à la dégradation que les anthocyanes acylés en tant que telle, la température d'extraction varie en fonction de la composition des anthocyanes à extraire. Il est recommandé de ne pas augmenter les températures au-delà de 50°C (**Brooks et Celli, 2019; Emile, 2010**). Les différences observées entre l'efficacité des combinaisons solvant/acide donnée peuvent s'expliquer par les différences de composition anthocyanique de chaque source (**Silva et al., 2017**).

Ce procédé est généralement long, fastidieux et nécessitent de grande quantité de solvant organique (**Michel, 2011**).

## **II.2. Extraction assistée par ultrasons (UAE)**

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. La propagation des ondes génère des cycles de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression) qui conduisent à des mouvements moléculaires. En effet, lors de la raréfaction, la distance entre les molécules est augmentée, ce qui forme des bulles de cavitations. La répétition des cycles

de compression et de raréfaction conduit à l'implosion des bulles de cavitation, ce qui libère une grande quantité d'énergie (**Pétrier et al., 2008**). Lorsque ces implosions sont proches d'une surface solide le cas d'une matrice, elles provoquent des jets de liquide qui vont percer les parois végétales et permettre la libération des molécules dans le milieu liquide (**Wang et Weller, 2006**) (**figure 03**).



**Figure 03** : Effondrement de bulles de cavitation et libération de matériel végétal (**Achat et al., 2020**).

L'extraction assistée par ultrasons est une méthode simple en manipulation et traitement. Grâce aux ultrasons, les extractions complètes peuvent maintenant être réalisées en quelques minutes avec un rendement élevé, réduisant la consommation de solvant et d'énergie, cependant le coût élevés (**Nguyen, 2018**).

Le tableau IV illustre quelques exemples d'utilisation des ultrasons pour l'extraction des anthocyanes.

**Tableau IV** : Extraction par ultrason des anthocyanes de quelques végétaux.

<b>Matrice</b>	<b>Conditions d'extractions</b>	<b>Teneur en anthocyane</b>	<b>Référence</b>
Choux rouge	Paramètres variés : <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Concentration en éthanol (5-75%)</li> <li>✓ Température (40 à 80°C)</li> <li>✓ Temps d'extraction : (5 à 75 min)</li> </ul> Fréquence constante à 37 kHz (Bain US)	Un rendement optimal de 58.67 mg /l pour les conditions de 75 min 40°C éthanol à 45%	<b>(Demirdöven et al., 2015)</b>
Pelure d'aubergine	Différents essais ont été réalisés pour chaque paramètre (Bain US) solvant/fréquence/température/temps : <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Méthanol, éthanol et 2-propanol</li> <li>✓ 0, 25 and 45 kHz</li> <li>✓ 50, 60 and 70°C</li> <li>✓ 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min</li> </ul>	La valeur la plus élevée était de 2,275 mg/kg pour les TMA pour les conditions suivantes : (méthanol, 45 kHz, 50°C pendant 50 min)	<b>(Dranca et Oroian, 2017)</b>
Choux rouge	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Solvant d'extraction : Éthanol /acide chlorhydrique : 15 :85.</li> <li>✓ Ratio : 1 :4</li> <li>✓ Temps : 10-25-40min.</li> <li>✓ Température : 40-55-70°C.</li> <li>✓ Fréquence : 35 kHz (Bain US)</li> </ul>	Un rendement optimal de 9.468158 mg/g de matière sèche a été obtenu pour les conditions suivant : 40min et 60.94°C. 35 kHz	<b>(Ghavidel et al., 2015)</b>
Choux rouge	Le solvant utilisé est l'eau (Bain US), différents essais ont été réalisés pour chaque paramètre : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Température : 15 à 45°C</li> <li>• Temps : 30 à 90 min</li> <li>• Puissance : 50 à 100w</li> </ul> Mode d'impulsion : 0.30 à 1	Le plus haut rendement d'anthocyanes (15.628mg /l) a été obtenue à 30°C, 60min, 100w, fréquence 30khz et 1 cycle d'impulsions	<b>(Ravanfar et al., 2015)</b>

TMA : teneur monomérique en anthocyanes.

Les fréquences les plus couramment utilisées dans les différents travaux publiés sont entre 20 et 45 kHz (**tableau IV**). De plus haute fréquences rendent plus difficile la cavitation. En effet, les bulles de cavitation ont besoin d'un petit laps de temps pour être générées pendant la phase de raréfaction. Plus la fréquence est élevée, plus les phases de raréfaction sont courtes donc moins la bulle a de chance d'être créée (**Veille et al., 2009**).

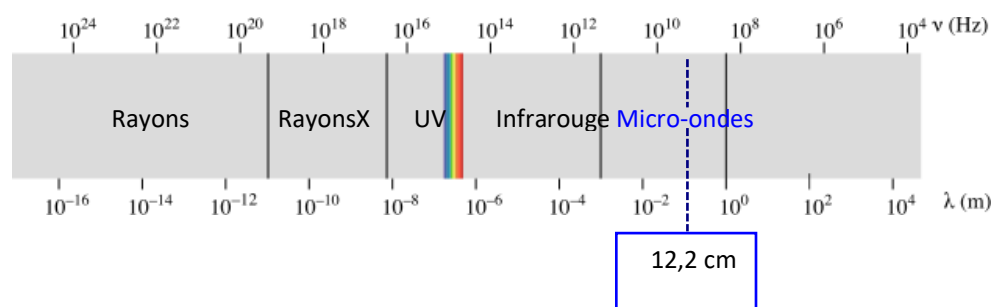
**Demirdöven et al., (2015)** ont rapporté que l'extraction par ultrason des anthocyanes du chou rouge augmente le rendement de 11.92% par rapport à une extraction conventionnelle par solvant dans les mêmes conditions de température, concentration en éthanol et temps d'extraction. Il a été conclu à la suite de l'optimisation effectuée que les anthocyanes peuvent être extraites à des températures relativement basse avec une réduction du temps d'extraction et concentration d'éthanol.

**Ferarsa et al., (2018)** lors de l'évaluation de l'extraction par ultrasons des anthocyanes de la pelure d'aubergine à différents intervalles de temps (10,20,30) min ont révélé que le rendement augmentait avec l'augmentation du temps d'extraction (la composition de l'extrait est plus riche à t 30min). Une différence est observée dans le profil en anthocyanes lors de l'extraction par ultrason par rapport à l'extraction conventionnelle par solvants. En effet l'analyse HPLC a identifié cinq composés dans les extraits ultrasoniques alors que trois composés seulement ont été identifiés dans les extraits obtenus par la méthode conventionnelle (**Ferarsa et al., 2018**). Cette différence est attribuée aux phénomènes de cavitations qui contribuent à l'amélioration de la diffusion des substances dissoutes de l'intérieur de la cellule vers le milieu d'extraction. (**Achat et al., 2012 ; Ravanfar et al., 2015**).

### **II.3. Extraction assistée par micro-onde (MAE)**

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques, possédant un champ électrique et magnétique perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, qui se propagent dans le vide avec des fréquences situées entre 300 MHz et 300 GHz. Néanmoins, dans le but d'éviter des interférences avec les radiocommunications et les radars, les micro-ondes domestiques et industrielles sont généralement utilisées à une fréquence de 2.45 GHz (**Camel, 2001**). Les micro-ondes sont positionnées sur le spectre électromagnétique entre les infra-rouges et les radiofréquences, avec des valeurs de longueurs d'ondes comprises entre 1 m et 1 cm (**figure 04**) (**Michel, 2011**).





**Figure 04 :** Représentation de spectre électromagnétique et positionnement des microondes domestiques (Michel, 2011).

L'extraction assistée par micro-ondes est une méthode simple, efficace utilisant moins de temps et de solvant. Cependant les inconvénients de cette technique sont d'une part le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires et d'autre part la température opératoire qui est relativement haute (Michel, 2011).

Le principe de l'extraction par micro-ondes est d'apporter, très sélectivement, une grande quantité d'énergie à l'intérieur de la cellule végétale ou biologique pour provoquer sa rupture sans dégrader les produits libérés. En absorbant l'énergie des microondes, l'eau présente dans la matrice végétale favorise la rupture des cellules facilitant ainsi la libération des substances chimiques de la matrice et améliorant leur extraction (Eldarra, 2013).

Il existe deux types de systèmes disponibles d'MAE dans le commerce : les enceintes d'extraction fermées sous pression et température contrôlées, et les fours à micro-ondes à pression atmosphérique (Kaufmann et Christen, 2002). Les enceintes fermées sont généralement utilisées pour l'extraction dans des conditions spécifiques telles que des températures élevées d'extraction. La pression dans l'enceinte dépend essentiellement du volume et du point d'ébullition du solvant. Le four à microondes peut être actionné à une température maximale déterminée par le point d'ébullition du solvant à la pression atmosphérique (Ben Amor, 2009).

Le tableau ci-après révèle des exemples d'extraction via le micro-ondes.

**Tableau V** : Extraction par microonde des anthocyanes de quelques végétaux.

Matrice	Conditions d'extractions	Teneur en anthocyanes	Référence
Blé bleu Mais violet Riz noir	<ul style="list-style-type: none"> <li>Solvant d'extraction : acétone/eau (60/40)</li> <li>T° : (50°C et 70°C)</li> <li>Puissance : (300 et 1200 w)</li> <li>Temps : (10min et 20 min)</li> </ul>	Les valeurs les plus élevées sont de 133.6 µg/g, 751.1µg/g de poudre pour le blé bleu et le maïs violet respectivement dans les conditions de 70 °C, 300 W, and 10 min et 2003µg/g de poudre pour le riz noir dans les conditions 50 °C, 1200 W, et 20 min.	<b>(Abdel-Aal et al., 2014)</b>
Choux rouge	<p>Solvant d'extraction est l'eau</p> <p>Différents essais ont été réalisés pour chaque paramètre :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ratio échantillons /eau : 1/3 à 1/5g/ml.</li> <li>Puissance d'extraction : 480 à 800 w.</li> <li>Temps : 120 à 480s.</li> </ul>	La valeur la plus élevée était de 1023.39 + 36.62 mg/cyanidine-3-glucoside équivalents par kg de chou rouge frais pour les conditions suivantes : 8min ; 800w et 1/3 g/ml.	<b>(Netramai1 et al., 2019).</b>
Cassis	<ul style="list-style-type: none"> <li>pH du solvant :(2-7).</li> <li>Temps :(10-30min).</li> <li>Puissance :(140-700w).</li> <li>Solvant (solution chlorhydrique aqueuse) :(1 :10-1 :20)</li> </ul>	La teneur la plus élevée été de 24.04±0.8mg/g pour les conditions suivantes : pH=2. Temps : 10min Puissance :700 w. Ration 1 :2.	<b>(Pap et al., 2012).</b>

**Netramai1 et al., (2019)** en comparant le rendement anthocyanique du chou rouge lors de l'extraction par microondes et l'extraction conventionnel à l'eau chaude ont constaté

que les microondes réduisaient significativement le temps d'extraction et augmentaient le rendement de 96.42% par rapport à la méthode conventionnelle.

#### **II.4. Extraction par fluide supercritique (SFE)**

L'état supercritique d'un composé organique pur est atteint lorsque celui-ci est placé dans des conditions de pression et de température supérieures aux valeurs de ses points critiques. Au-delà de ces valeurs le fluide est dit supercritique et possède des propriétés à la fois proche d'un gaz et d'un liquide qui vont être intéressantes pour l'extraction de la molécule à partir de matière végétale. En effet, un fluide supercritique possède un coefficient de diffusion plus élevé et une viscosité plus faible qu'un liquide ce qui réduit les tensions de surface et permet un meilleur transfert de masse et donc une meilleure cinétique et efficacité d'extraction (**Wang et Weller, 2006**).

La SFE est principalement utilisé avec le CO<sub>2</sub> supercritique, car celui-ci est peu coûteux (sous-produit de l'industrie), non-inflammable, largement présent dans l'atmosphère, facile à éliminer et nécessite des conditions critiques faciles à atteindre (T = 31.1°C, P = 73.8 bar). Ainsi les principaux avantages de la SFE sont l'obtention d'un échantillon concentré et son pouvoir solvant (**Michel, 2011**).

Pendant le processus d'extraction, le fluide est pompé de manière continue à travers l'échantillon, et libère ainsi les composés d'intérêt qui sont récupérés sous forme concentrés après une étape de pressurisation qui élimine le CO<sub>2</sub> sous forme gazeuse. Cependant, en plus du coût de l'appareillage, l'un des désavantages majeurs de l'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique est l'hydrophobicité de ce composé qui limite l'extraction à des molécules apolaires et qui nécessite l'ajout de Co-solvants comme le méthanol ou l'éthanol pour permettre l'extraction de molécules plus polaires (**Herrero et al., 2010**).

**Ghafor et al., (2010)** ont étudié l'extraction des anthocyanes de peaux de raisin à l'aide de SFE. Ils ont rapporté que pour cette matrice les conditions optimales de SFE été de 45°C et de 16MPa en présence de 6 à 7% d'éthanol. Ces conditions se rapprochent à celles rapportées par **Seabra et al., (2010)** pour l'extraction des anthocyanes de marc de sureau, et à celles enregistrées par **Paes et al., (2014)** pour les résidus du myrtille. 40°C et 20-21MPa en utilisant l'éthanol aqueux comme Co-solvant. Comme les anthocyanes sont sensibles à des températures relativement élevées, il est intéressant de noter que la plupart des auteurs qui se

concentrent sur ces composées n'utilisent pas des températures supérieures à 40°C (**Paes et al., 2014 ; Paula et al., 2014**).

*Détermination des  
anthocyanes*

### III. Dosage et caractérisation des anthocyanes

De nombreuses méthodes ont été développées pour la caractérisation des anthocyanes. Généralement, les analyses de routine des anthocyanes font appel à des techniques spectrophotométriques et chromatographiques (Valls *et al.*, 2009).

#### III.1. Méthodes Spectrales

##### III.1.1. Uv-visible

La spectrophotométrie permet de mesurer l'absorbance d'une molécule à une longueur d'onde donnée. Une solution est colorée si elle absorbe une partie des radiations de la lumière blanche. (Nguyen, 2018).

Les propriétés spectrales UV-visibles sont souvent très utiles pour la caractérisation des anthocyanes, spécialement pour identifier le type (Rivas-gonzalo, 2003). Les anthocyanes présentent des maxima d'absorption dans la région du visible (510-528 nm, dans le cas de celles du vin) aussi bien dans la région de l'UV(270-280nm). L'absorbance est dû à la structure de l'hétérocycle central et à la conjugaison des deux cycles aromatiques, et celle-ci est influencée par le pH et le type de solvant. Les groupements fonctionnels du cycle aromatique (cycle B) de l'ion oxonium peuvent aussi exercer une certaine influence sur l'absorbance, si bien que les anthocyanes qui possèdent deux groupements fonctionnels sur ce cycle (la cyanidine et la péonidine) possèdent des maxima d'absorption de 11nm plus bas que celles avec trois groupement fonctionnels (la delphinidine, la petunidine et la malvidine). La substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles sur le cycle B provoque un déplacement de l'absorption vers des longueurs d'ondes plus courtes (effet hypsochrome), apportant ainsi une grande stabilité à la molécule (Emile, 2010).

##### III.1.2. pH différentielles

La méthode spectrophotométrique des pH différentiels permet une mesure rapide et précise des anthocyanes totaux même en présence de pigments polymérisés dégradés et d'autres composés interférents. Elle est basée sur la détermination de l'absorbance des solutions extractives diluées avec des solutions tampon de pH = 1 et de pH = 4,5.

Les anthocyanes se transforment réversiblement sous l'influence du pH. Le changement structurel associé avec la modification des chromophores détermine la couleur

différente des solutions des anthocyanes en fonction du pH. La forme colorée (oxonium) prédomine à pH 1 et la forme incolore (hémiacétal) à pH 4,5. (Ali Rachedi, 2018).

L'absorbance de l'échantillon dilué A est comme suite :

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700}) \text{ pH } 1.0 - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700}) \text{ pH } 4.5$$

D'où la concentration des pigments en anthocyanes monomères dans l'échantillon initial est calculée comme suite (Ali Rachedi, 2018) :

$$C = \frac{A \times M \times D \times 1000}{\epsilon \times l}$$

C : concentration de solution mg/L

A : absorbance des solutions diluées.

M : masse molaire de l'anthocyane de laquelle on exprime le contenu (M = 449.2 g/mol pour cyanidin-3- glucoside).

$\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire.

l : = 1cm.

1000 : facteur pour transformer de g à mg.

D : facteur de dilution de l'échantillon.

### III.1.3. Spectrométrie de masse (MS)

Les derniers instruments de spectroscopie de masse doté d'une sensibilité et d'une sélectivité élevée sont capables de détecter des composés cibles dans différentes matrices (kasotu et al., 2019). Les anthocyanes sont déterminés par la masse des ions moléculaires dans l'échantillon et l'identification des fragments provenant de la rupture des composés à travers l'application d'une haute énergie d'ionisation. L'étude de la fragmentation des anthocyanes accentue le fait qu'elles ont une répétition de molécule de fragmentation. L'identification de ses modèles peut s'avérer utile pour identifier les composés originaux. L'introduction de la technique de bombardement rapide d'atomes spectrométrie de masse (Strack et Wray, 1989) et l'ionisation par jet d'électron spectroscopie de masse (Baldi et al., 1995) ont permis une grande avancée dans l'identification structural des composés chimiques, spécialement de l'analyse des anthocyanes.

## III.2. Chromatographie

### III.2.1. Chromatographique en phase liquide à haute performance (HPLC)

Il est difficile de séparer les différents anthocyanes d'un extrait puisque leurs squelettes carbonés de base des différents aglycones diffèrent très peu les uns des autres. Pour cette raison, les techniques chromatographiques sont le choix par excellence, autant pour séparer les diverses fractions d'anthocyanes que pour obtenir des pigments purs qui permettront une identification et une quantification subséquentes (**Escribano-Baillon et Santos-Buelga, 2003**).

La technique chromatographique de choix utilisée pour la purification et la séparation des anthocyanes est la chromatographique en phase liquide à haute performance (HPLC) (**Emile, 2010**). Celle-ci permet une séparation, une identification et une quantification simultanées sans exiger une pureté excessive des extraits. Comparativement à la CPG (chromatographie en phase gazeuse), elle permet une séparation rapide des échantillons. Cependant, une extraction par phase solide sur des cartouches C-18 ou Sephadex est couramment utilisée pour une purification initiale des extraits bruts d'anthocyanes avant l'analyse par HPLC. Les anthocyanes se lient fortement à ces adsorbants à travers leurs groupements hydroxyles non substitués et sont éluées en utilisant une série de solvants de polarité croissante. Étant donné la polarité des différents anthocyanes, l'analyse par HPLC en phase inverse est généralement effectuée en établissant un gradient linéaire ou autre, entre une phase aqueuse suffisamment acidifiée et une phase organique (méthanol, acétonitrile ou acétone), dont la proportion augmente continuellement au cours de l'analyse. Étant donné que chaque laboratoire de recherche a tendance à développer une méthode analytique pour des besoins spécifiques de séparation, il est impossible de décrire une bonne méthode standard. L'HPLC étant une méthode largement utilisée, elle présente une meilleure sensibilité comparativement à la spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) à haute résolution, cependant, elle exige une préparation des échantillons avant les analyses (**Kosir et Kidric, 2002 ; Escribano-Baillon et Santos-Buelga, 2003**).

### III.2.2. Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS)

La caractérisation des mélanges d'anthocyanes implique habituellement la séparation, la collection de chaque composé et des analyses subséquentes. L'HPLC-MS combine la séparation par HPLC avec la sélectivité et la sensibilité d'un détecteur spectrométrie de masse (MS) permettant l'identification des composantes individuelles d'un mélange des substances.



Les anthocyanes sont séparés dans une colonne HPLC à phase inversée ou normale de calibre étroit avec un gradient d'élution utilisant l'acétonitrile, l'eau et l'acide acétique. Généralement, un spectromètre de masse à triple quadrupoles est utilisé. À titre d'exemple, plusieurs dérivés de la cyanidine ont été identifiés y compris les cyanidines acylées et non acylées. Les méthodes d'ionisation à pression atmosphérique : l'ionisation par jet d'électrons (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui permettent la soumission à l'analyse spectrométrique de masse, se sont avérées appropriées pour le couplage avec l'HPLC (Gaskel, 1997).

### **III.2.3. Chromatographie couplée à barrette d'iode HPLC-DAD**

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une méthode utilisée pour qualifier et quantifier les composés dans les extraits des végétaux (Gupta, Sreelakshmi, et Sharma, 2015).

L'introduction dans les années 80 du spectrophotomètre de détection à faisceaux d'iode ou 'Diode Array Detection' (DAD) associé à l'HPLC (HPLC-DAD) a ouvert de nouvelles perspectives qui ont permis d'importants perfectionnements dans la séparation, l'identification et la quantification des anthocyanes. Ceci a permis l'acquisition de spectres UV-Visibles en ligne durant les analyses chromatographiques, c'est-à-dire que les caractéristiques de rétention et les spectres UV-Visibles peuvent être utilisés à ces fins. En HPLC-DAD l'éluant chromatographique est scanné pour avoir des données spectrales UV visibles qui sont sauvegardées et qui peuvent être comparées plus tard à une librairie de référence pour l'identification des pics. Ce type de détecteur permet un enregistrement simultané des chromatogrammes à différentes longueurs d'ondes facilitant ainsi une détection sélective des différents anthocyanes aux longueurs d'ondes auxquelles elles présentent un maximum d'absorption. Ce qui permet d'améliorer les possibilités de quantification. La sensibilité peut être améliorée par une sélection adéquate de la longueur d'onde pouvant permettre la quantification d'un composé même si la résolution est faible (Emile, 2010).

### **III.2.4. Chromatographie couplée à barrette d'iode et à la spectrométrie de masse (HPLC-DAD-MS)**

L'application de HPLC-DAD-MS utilisant l'ionisation par jet d'électrons (ESI) a facilité l'identification des anthocyanes de plusieurs échantillons de végétaux comme par

exemple la carotte noire, le raisin, la fraise, l'épis de maïs (**De Pascual-Teresa et al., 2002**) et le vin rouge (**Mateus et al., 2002**).

*Réactivité des  
anthocyanes et  
facteurs influençant  
leur stabilité*

## IV. Réactivité des anthocyanes et facteurs influençant leur stabilité

Les solvants, la température de stockage, le pH, la concentration, la structure des anthocyanes, les copigments, l'oxygène, la lumière, l'utilisation de polyphénols, la présence d'enzymes et d'autres matériaux qui y sont liés ont une incidence importante sur la stabilité des anthocyanes (**Chung et al., 2016; Jiao et al., 2016**).

### IV.1. Effet du pH

Les anthocyanes sont plus stables en milieu acide que dans les solutions alcalines. Cependant, les anthocyanes sont connus pour afficher une grande variation de couleurs dans la gamme de pH de 1 à 14. En effet, la nature ionique des anthocyanes permet des changements de la structure de la molécule selon le pH donnant plusieurs couleurs et teintes à différentes valeurs de pH (**Brouillard, 1982**).

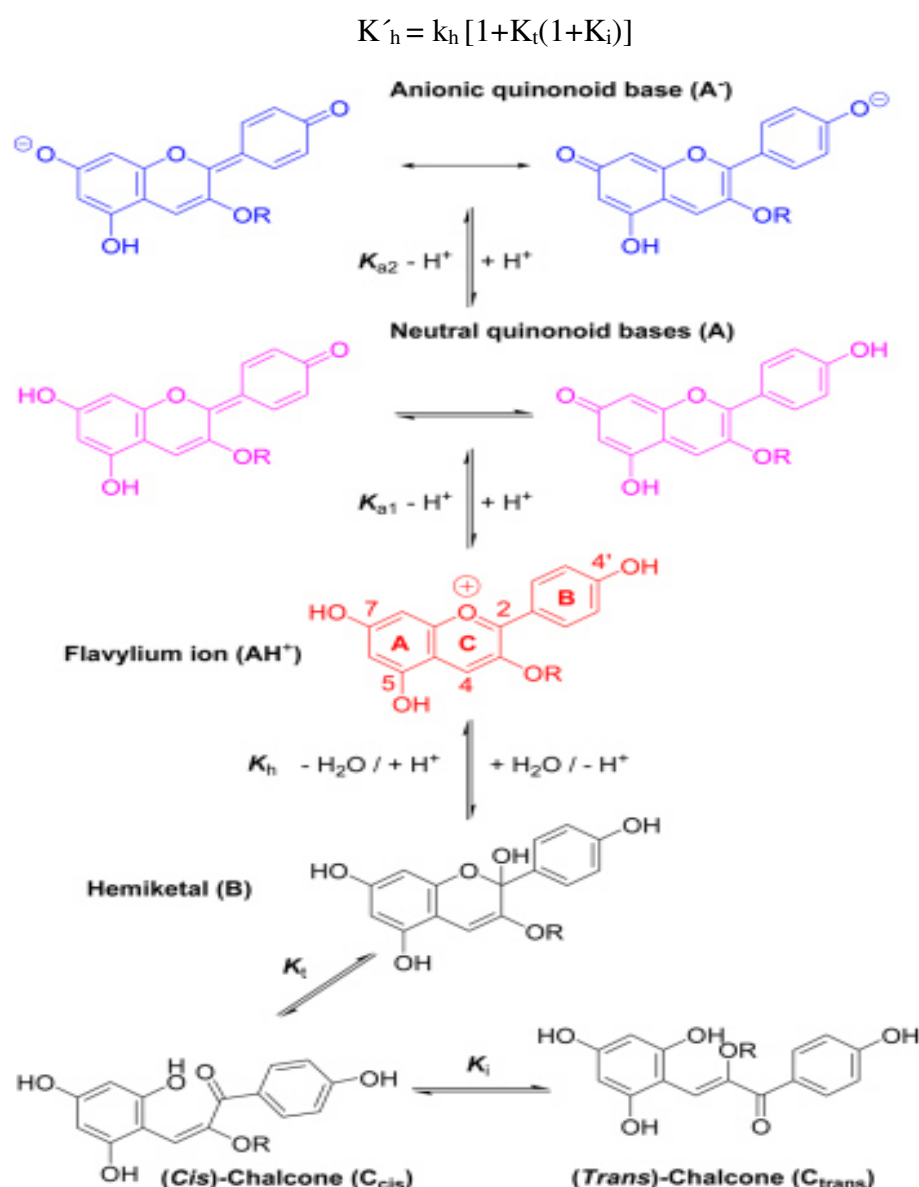
Dans un milieu très acide (pH 1-2) le cation flavylum ( $AH^+$ ) est l'espèce prédominante, en général les expériences sont réalisées à pH= 2 pour assurer sa présence exclusive en solution. Dans les conditions de pH prévalent dans les plantes et les produits végétaux (pH = 3- 8), les anthocyanes sont des diacides avec deux valeurs de pKa successives d'environ 4 et 7. Ainsi, le cation ( $AH^+$ ) perd un proton dans des conditions légèrement acides et est converti en un mélange de tautomères de méthide de quinone neutres, qui sont connues sous le nom de bases, formées après déprotonation de l'un des trois groupes phénoliques OH les plus acides (C7-OH, C4'-OH ou C5-OH, respectivement). La déprotonation de ces bases quinoidales (A), à un pH proche de la neutralité, donne des formes de bases quinoidales anioniques ( $A^-$ ) (**Pina et al., 2012; Trouillas et al., 2016**).

A pH supérieur à 2 le cation flavylum des anthocyanes non acylés sont aussi propices à une hydratation par une attaque nucléophile de l'eau au niveau C<sub>2</sub> conduisant à l'équilibre à la formation d'un mélange incolore hémicétal (B ou AOH). L'hémicétal est impliqué dans un processus de tautomérisation qui conduit à l'ouverture de l'anneau avec la formation d'un cis-chalcone. Enfin, le cis-chalcone isomérise et donne le trans-chalcone (**figure 05**).

Ces deux réactions parallèles sont en compétition et se produisent à des intervalles de temps différents : transfert de proton en microseconde et hydratation en quelques sous-secondes à quelques minutes selon le pH (**Pina et al., 2012; Trouillas et al., 2016**).

Les quantités relatives des cations flavylum ( $AH^+$ ), de la base quinoidale (A), de l'hémicétal (carbinol) (B) et de la chalcone (C) en équilibre varient en fonction du pH et de la structure de l'anthocyane. (Trouillas *et al.*, 2016)

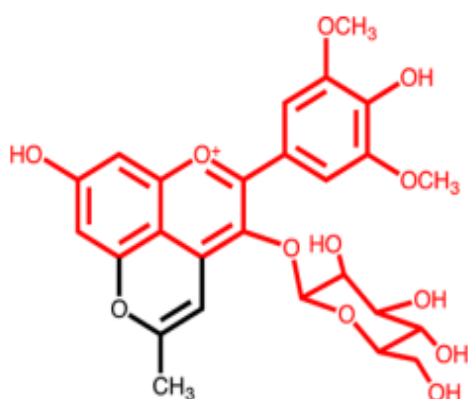
Les constantes d'hydratation ( $K_h$ ) et d'acidité ( $K_a$ ) sont des constantes thermodynamiques, qui permettent de calculer et définir la répartition entre les différentes formes des anthocyanes en équilibre dans un milieu aqueux (He *et al.*, 2012). L'équilibre d'hydratation global reliant  $AH^+$  et les autres formes à l'équilibre, est donné par l'ensemble de la constante thermodynamique  $K'_h$  (Pina, 2014).



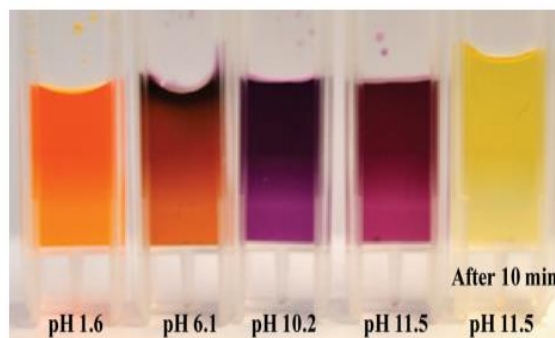
**Figure 05 :** Transformations structurales des anthocyanes en solution aqueuse acide (Trouillas *et al.*, 2016)

Le noyau anthocyanidine est un système conjugué  $\pi$  entièrement délocalisé, c'est pourquoi ces composés peuvent absorber la lumière visible. Cependant, la couleur est fortement affectée par le pH et l'hydratation. A savoir: le cation flavylium ( $AH^+$ ) rouge, la base quinoidale (A) violet, les anions ( $A^-$ ) sont bleus, la pseudo-base carbinol ou hémicétal (incolore) et la chalcone (incolore à légèrement jaune) (**Nave et al., 2010**).

**Oliveira et al., (2011)** ont étudié le comportement du méthylpyranomalvidine-3-O-glucoside (**figure 06**) (anthocyane identifiée dans le vin rouge) dans l'eau à différentes valeurs de pH par spectroscopie RMN et UV-visible. Les résultats ont révélé que le composé est très stable et que les principales réactions résultent de la déprotonation rapide en position 7-OH et 4'-OH du cation méthylpyranoflavylium, respectivement pour former les bases quinoidales et ions quinoidales respectives. Ces réactions sont très rapides, et ce n'est qu'à des valeurs de pH très basiques que la dernière forme (hémicétal/cis-chalcone) apparaît et prend quelques minutes à se former (**figure 07**).

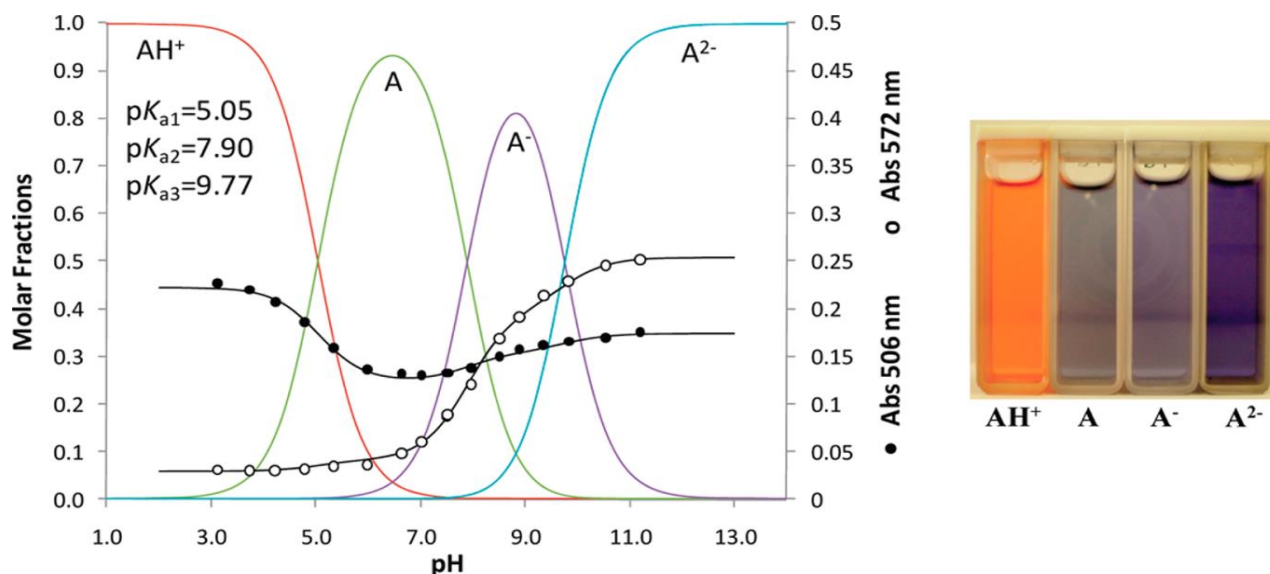


**Figure 06 :** Structure de la méthylpyranoflavylium (**Pina, 2014**).



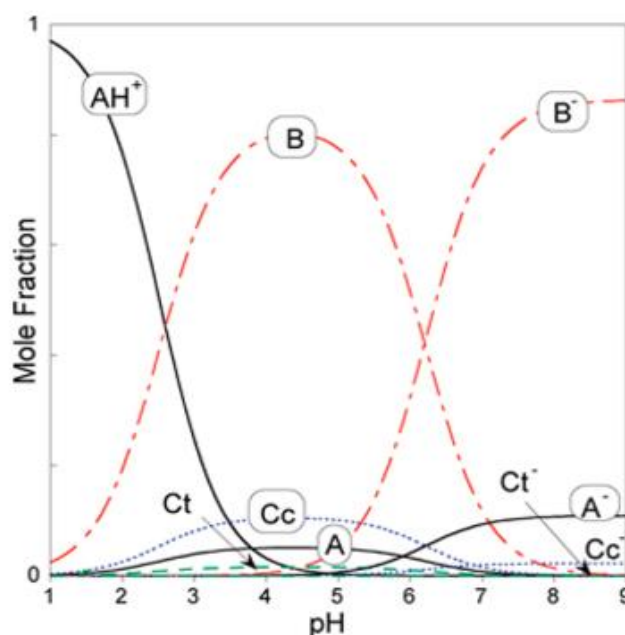
**Figure 07:** Réactivité de la méthylpyranoflavylium dans l'eau à différentes valeurs de pH (**Oliveira et al., 2011**).

Un autre exemple est l'étude de (**Cruz et al., 2010**) de la pyranomalvidin-3-O-coumaroylglucoside-(+)-catechin. Comme dans l'exemple précédent, l'équilibre est établi entre le cation flavylium et la base quinoidale et les bases quinoidales ionisées respectives (**figure 08**).



**Figure 08 :** Répartition de la fraction molaire du cation flavylum et des bases quinoïdales du pyranomalvidine-3-O coumaroylglucoside-(+)-catéchine (Cruz et al., 2010).

Le comportement du composé malvidin-3-Oglucoside-catéchine est différent des composés précédents mais commun à la plupart des anthocyanes rencontrés dans la nature ; en effet le produit principal dans la solution avec l'augmentation du pH au-dessus de 3 est la forme incolore carbinol (B), comme représenté sur la **Figure (09)**. Ce graphique montre qu'à pH 1, le cation flavylum est l'espèce prédominante. Pour des valeurs de pH comprises entre 3 et 6, l'espèce prédominante est la pseudo base du carbinol. Pour des valeurs de pH supérieures à 6, deux espèces peuvent être observées, la base quinoïdale et la chalcone. La catéchine en position 8 n'affecte pas significativement le comportement de l'anthocyanoside (malvidine-3-O-glucoside) (Nave et al., 2010).



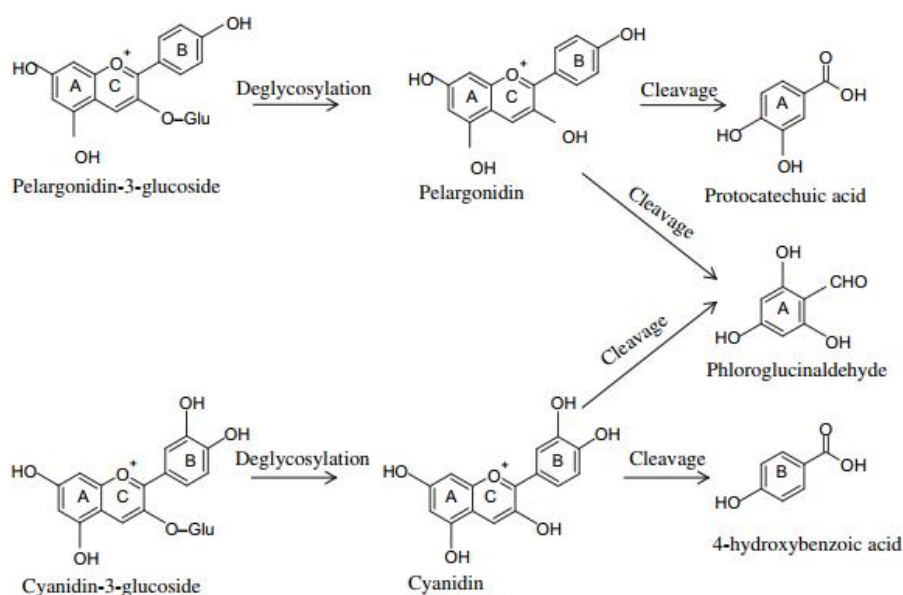
**Figure 09 :** Distribution des différentes formes en équilibre du malvidin-3-Oglucoside-catéchine glucoside selon le pH (Nave *et al.*, 2010).

## IV.2. Effet de la température

Comme pour la plupart des réactions chimiques, la stabilité des anthocyanes et la vitesse de leur dégradation sont fortement influencées par la température. La déprotonation du cation flavylum par solvant ( $AH^+ \rightarrow A \rightarrow A^-$ ) est exothermique, tandis que l'hydratation cationique ( $AH^+ \rightarrow AOH = B$ ) et l'ouverture du cycle pyrylium ( $B \rightarrow CE$ ) sont endothermiques (Jackman et Smith, 1996). Ainsi, à moins que des caractéristiques structurales ou d'autres facteurs ne réussissent à inverser l'équilibre vers la formation du cation flavylum ou de la base quinoïdale, la formation de chalcone est favorisée par l'augmentation de la température (à savoir pendant l'entreposage et le traitement) au détriment des espèces quinoïdale, flavylique et hémiacétal (Nguyen, 2018).

Sadilova *et al.*, (2006) ont étudié la dégradation thermique des anthocyanes par HPLC-DAD-MS et évalué le profil de dégradation des fraises et des baies de sureaux. Après un traitement de 4 h à 95°C et à pH= 1 la thermodégradation commence par une déglycosylation suivie d'un clivage conduisant à la libération des anneaux A et B de l'anthocyanidine. L'identification des produits de dégradation indiquait qu'il s'agissait de l'acide 3, 4-hydroxybenzoïque (acide protocatéchuique), produit de clivage du cycle B de la pélargonidine. Le cycle A de l'anthocyanidine a été dégradé en phloroglucinaldéhyde. La figure (10) montre la dégradation des anthocyanes et la formation de divers composés intermédiaires.





**Figure 10 :** Mécanisme de la dégradation thermique de deux anthocyanes communs (Patras et al., 2010).

Zhang et al., (2020) dans leur étude de la dégradation des anthocyanes de la pelure d'aubergine dans des aliments modélisés enrichis durant le traitement thermique (vapeur et ébullition), ont pu identifier deux composés de dégradation : l'acide gallique et le phloroglucinaldéhyde. Ces deux composés ont été également identifiés dans d'autres travaux (Sinela et al., 2017; Sun et al., 2011). Ainsi la voie de dégradation de la delphinidine-3-O-rutinoside (anthocyanes identifié dans la pelure d'aubergine) a d'abord pu être hydrolysée en delphinidine qui a été décomposée à son tour en acide gallique et en phloroglucinaldéhyde. L'acide gallique peut être oxydé en pyrogallol et le phloroglucinaldéhyde peut être condensé avec des composés aminés ou oxydés en phloroglucinol (Zhang et al., 2020).

Sinela et al., (2017) ont également signalé que le produit de dégradation (acide protocatéchuic) de la cyanidine-3-O-sambubioside en solution aqueuse a augmenté pendant 40 jours d'incubation à 37 °C, puis son contenu a diminué.

Oancea et al., (2018) dans leur étude de la cinétique de la dégradation thermique des composés polyphénoliques des extraits de sureau (*Sambucus nigra L*), ont constaté qu'après 90 minutes de traitement thermique à 100 et 150° C, la dégradation des anthocyanes totaux était d'environ 58 et 100 %, respectivement.

### IV.3. Structure de l'anthocyane

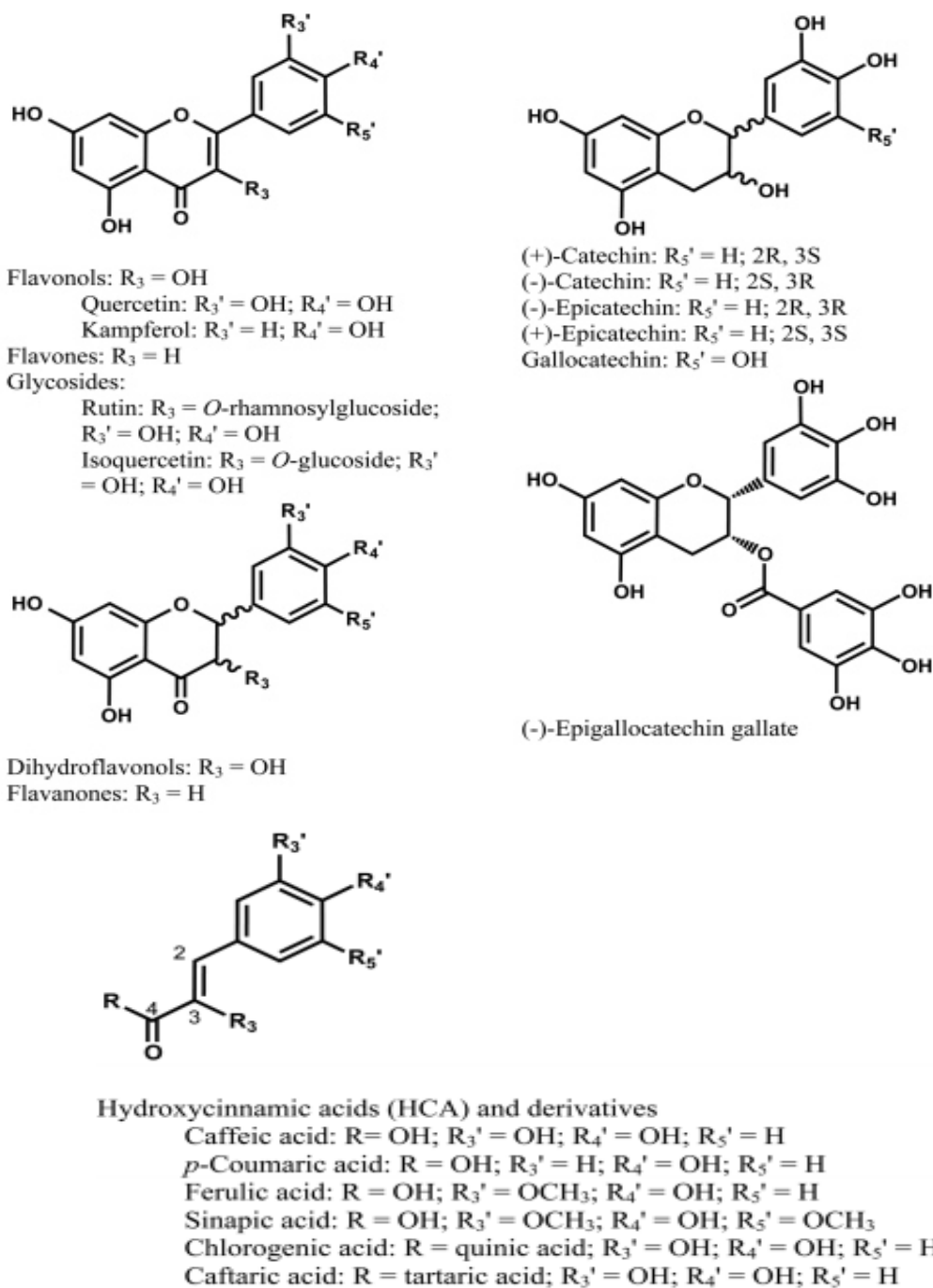
Les unités glycosyles et les groupes acyles fixés à l'aglycone et leur site de liaison ont un effet significatif sur la stabilité et la réactivité de l'anthocyane. De plus, le type de substitution de l'anthocyane, le nombre et l'emplacement des groupes hydroxyles et méthoxyles dans l'aglycone, affectent le comportement chimique du pigment (**Rein, 2005**).

L'augmentation de l'hydroxylation de l'aglycone peut stabiliser l'anthocyanidine dans certains solvants ; la delphinidine est plus stable que la cyanidine dans le méthanol acide (**Dao et al., 1998**). Cependant, il existe des divergences liées à l'effet de l'hydroxylation de l'aglycone dans la stabilité de la molécule. Dans une solution tamponnée à pH 3,1, la cyanidine 3-glucoside (2 OH sur le noyau B) a montré une plus grande stabilité que la pélargonidine 3-glucoside (1 OH) mais la delphinidine 3-glucoside (3 OH) est moins stable que la cyanidine 3-glucoside (**Cabrita et al., 2000**). La pétunidine 3-glucoside (2 OH et 1 OCH<sub>3</sub>) est moins stable que la péonidine 3-glucoside (1 OH et 1 OCH<sub>3</sub>) (**Cabrita et al., 2000**). L'augmentation de la méthylation des groupes hydroxyles affaiblit la stabilité des anthocyanes, notamment en position C<sup>4</sup> et C<sup>5</sup> du noyau B (**Mazza et Brouillard, 1987**). Dans une solution tamponnée à pH 3, après 8 jours de stockage à 10°C, la cyanidine 3-glucoside est plus stable que la pétunidine 3-glucoside, qui diffère de la première par une méthylation du C<sup>5</sup> (**Cabrita et al., 2000**).

### IV.4. Copigmentation, auto- association et complexation métallique

La copigmentation est un phénomène dans lequel les pigments et d'autres composés organiques incolores ou des ions métalliques, forment des associations moléculaires ou complexes, générant un changement ou une augmentation dans l'intensité de la couleur (**Boulton, 2001**).

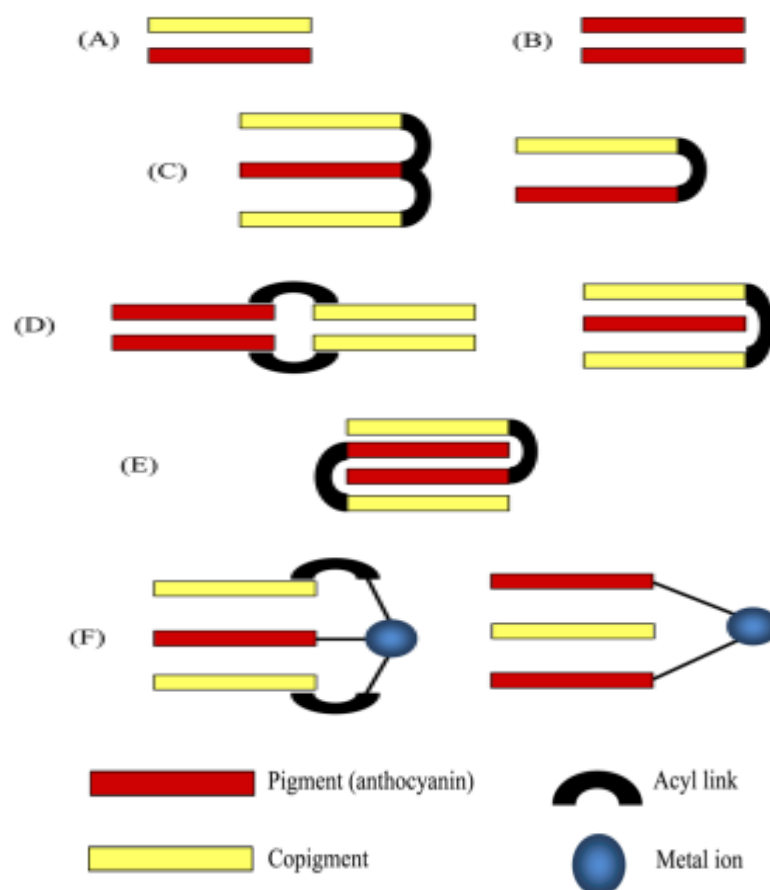
Les copigments possèdent généralement des systèmes conjugués- $\pi$  suffisamment étendus permettant ainsi les interactions d'empilements  $\pi$ - $\pi$ , et des groupes donneurs/accepteurs d'hydrogène tel que OH et C=O. La majorité des copigments identifiés sont les tanins hydrolysables, flavonoides, et les acides phénoliques. Les flavonoides semblent être les copigments les plus efficaces, provoquant de forts effets bathochromiques et hyperchromiques. Les acides hydroxycinnamiques (HCA) et leurs dérivés (**figure 11**) sont communément rapporté comme étant des copigments d'une efficacité comparable à celle des flavonoïdes. Les acides benzoïques sont généralement moins efficaces que les HCAs (**Baranac et al., 1997; Di Meo et al., 2012; Malaj et al., 2013**)



**Figure 11:** Structure chimique de quelques copigments (Trouillas *et al.*, 2016)

La copigmentation peut être obtenue via plusieurs interactions. Les mécanismes de copigmentation sont intramoléculaires et intermoléculaires (formations de complexes). L'auto-association et la complexation de métaux sont également des moyens possibles par lesquels se produit la copigmentation (figure 12) (Timberlake et Bridle, 1967 ; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Les interactions intramoléculaires ont lieu lorsqu'un acide organique, un groupe acyle aromatique ou un flavonoïde (ou encore une combinaison de ceux-ci) sont liés de manière covalente à un chromophore anthocyanique, tandis que dans les interactions intermoléculaires prédominent probablement les forces de Van der Waals et l'effet hydrophobe qui conduit à un «empilage» de la molécule d'anthocyane avec le copigment (Bloor et Falshaw, 2000 ; Brouillard, 1981 ; Dangles *et al.*, 1993).



**Figure 12 :** Les différentes interactions possibles des anthocyanes (Trouillas *et al.*, 2016).

(A) : copigmentation intermoléculaire. (B) : auto-association. (C) : copigmentation intramoléculaire des anthocyanes acylés (D) : auto-association des anthocyanes acylés. (E) : intercalation de la copigmentation intermoléculaire. (F) : copigmentation des anthocyanes complexés aux métaux.

Malien-Aubert *et al.*, (2001) ont étudié la stabilité de la couleur des extraits commerciaux à base d'anthocyanes en relation avec la composition phénolique. Le pH a été varié de 3, 4 puis à 5 conserver à une température de 50°C pendant 72h. les caractéristiques spectrales dans la plage du visible des échantillons ( $\lambda_{max}$ ) ont été mesuré à  $t_0$  et  $t_{72}$ . A  $t_0$   $\lambda_{max}$

s'étend de 515 nm (Aronia à pH 3) jusqu'à 549 nm (chou rouge à pH 5), ce qui correspond à une teinte allant de l'orange au violet.

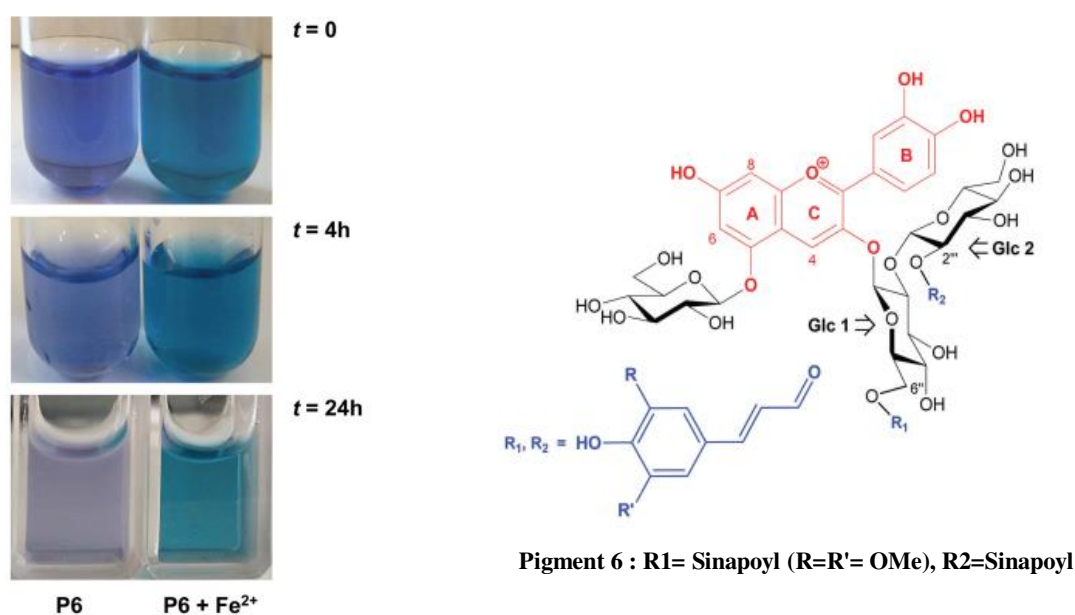
A  $t_{72}$  d'entreposage, les colorants dépourvus d'anthocyanes acylés (marc de raisin, baie de sureau, cassis et Aronia) affichaient des valeurs  $\lambda_{\max} < 500$  nm donnant ainsi des teintes jaunâtres. En revanche, les colorants contenant les anthocyanes acylés (radis rouge, choux rouge et carottes violette) étaient relativement stables à toutes les valeurs de pH et affichaient une constante Valeur de  $\lambda_{\max}$ .

Les auteurs expliquent cette différence de stabilité par une copigmentation intramoléculaire. En effet les groupement acyles aromatiques des anthocyanes sont connue pour s'empiler sur le noyau flavylium et le protéger ainsi contre une attaque nucléophile d'eau qui conduit au formes incolore (**Brouillard, 1982**), par conséquent la concentration en formes incolore (chalcone) est inférieur à celle des pigments non acylés correspondant. La différence de la couleur observée dans la carotte violette, le chou rouge, et le radis rouge peut être liés aux déférents anthocyanes acylés présent. Les colorants de la carotte violette s'estompent plus rapidement que les colorants du radis rouge et choux rouge ces derniers contiennent des anthocyanes diacylés dont les groupement acyles aromatiques peuvent s'empiler simultanément sur les deux faces du chromophore (complexe de type sandwich) offrant ainsi une protection optimale (**Brouillard, 1982 ; Dangles et al 1993**) en revanche les anthocyanes monoacylés présentes dans la carotte violette n'a qu'une seule face de son noyau flavylium protégé (**Malien-Aubert et al., 2001**).

**Molonyle et al., (2018)** ont largement étudiés les anthocyanes mono et diacylés du chou rouge, de leurs transformations structurales dans des conditions acides à légèrement alcalines et leurs couleurs résultants. Les résultats ont montré que les résidus HCAs favorisent les interaction d'empilement  $\pi$ - $\pi$  entre les noyaux phénoliques, protégeant ainsi efficacement le chromophore cyanidine contre l'attaque nucléophile de l'eau conduisant à des formes incolores. Les constantes de vitesse de la réaction d'hydratation sont de  $0.3 \text{ s}^{-1}$  pour le pigment non acylés, entre  $0.1$  et  $0.2 \text{ s}^{-1}$  pour les pigments monoacylés et de l'ordre de  $0.01 \text{ s}^{-1}$  pour les pigments diacylés. Par contre les constantes thermodynamiques de transfert de protons entre les formes cationiques et neutre sont faiblement affectées par l'acylation. Ainsi par les interactions  $\pi$  les anthocyanes diacylés maintiennent un pourcentage plus élevés des formes colorées à l'équilibre dans des conditions légèrement acides. Dans des conditions neutres légèrement alcalines les formes anioniques sont persistantes exprimant des couleurs bleues intenses. Les données RMN

et du dichroïsme circulaire (CD) suggèrent qu'une combinaison d'interaction cyanidin-HCA (copigmentation intramoléculaire) et cyanidine-cyanidine (auto-association), opère dans le mécanisme de stabilisation de la couleur, ce qui se traduit aussi par une stabilité améliorée à long terme dans les conditions légèrement alcalines.

**Fenger et al, (2019)** ont étudié l'influence de la complexation métallique sur la stabilité thermique des anthocyanes acylés et non acylés du chou rouge par addition du  $\text{Fe}^{2+}$  dans une solution d'anthocyanes dans un tampon phosphate dilué (pH=7) à une température de  $50^\circ\text{C}$  pendant 24h. Les résultats ont montré que le  $\text{Fe}^{2+}$  avait une forte influence sur la stabilité de la couleur. Les demi vies de la couleur des anthocyanes sont 4 jusqu'à 5 fois plus grande que les anthocyanes non complexés. Avec les bases quinoidales le complexe métallique empêche l'hydratation et sont probablement moins propice à une autoxydation. Par contre pas de stabilisation de la couleur pour les anthocyanes non acylés. Encore une fois les résidus HCA sont cruciales pour la stabilité des complexes métalliques (**figure 13**).



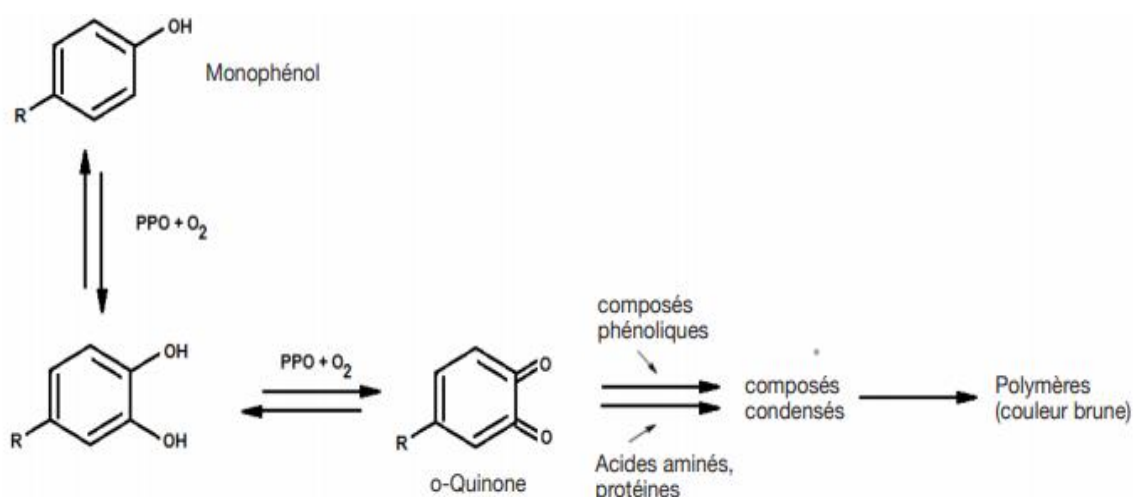
**Figure 13** : Changement de couleur de la solution P6 a pH =7 et  $50^\circ\text{C}$  après addition du  $\text{Fe}^{2+}$  pendant 24h (concentration en pigment=  $50 \mu\text{M}$ ) (**Fenger et al, 2019**).

## IV.5. Dégradation des anthocyanes

Dans certaines conditions de pH et température, les anthocyanes se dégradent en présence d'oxygène, d'ions métalliques, d'enzymes et de lumière. Cette dégradation est accompagnée d'une augmentation de la concentration de composés formés par la condensation des produits de dégradation des anthocyanes et d'autres polyphénols présents dans le milieu. Il s'ensuit une formation de polymères qui, avec le temps, deviennent plus volumineux et tendent à précipiter (Beye *et al.*, 2015).

### IV.5.1. Oxydation enzymatique

Les polyphénoloxydase (PPO) sont des enzymes endogènes responsables du phénomène de brunissement des fruits. Elle oxyde les polyphénols en quinones, lesquels s'associent aux anthocyanes pour former des composés bruns (Li *et al.*, 2008).



**Figure14** : Mécanisme d'oxydation des polyphénols par la polyphénol oxydase (Beye *et al.*, 2015)

En présence d'oxygène, l'PPO catalyse l'oxydation de l'acide chlorogénique (CG) en l'O-quinone correspondant (chlorogénoquinone, CGQ). Cette quinone réagit avec les anthocyanes pour former des produits de condensation bruns (figure 14) (Kader *et al.*, 1999). Dans une étude distincte (Kader *et al.*, 2001), ont démontré que les anthocyanes, comme la pelargonidine-3-glucoside (Pg 3-glc), sont dégradés par un mécanisme impliquant une réaction entre l'O-quinone et/ou les produits d'oxydations secondaires formés à partir de la quinone et du pigment anthocyanique. Ces observations confirment que la PPO joue un rôle

vital dans la dégradation des anthocyanes. Un traitement thermique à 50 °C permet de réduire significativement l'effet de cette enzyme (Patras *et al.*, 2010).

Un des phénomènes de dégradation enzymatique des anthocyanes met en jeu des glycosidases d'origine microbienne. Elle entraîne la production d'anthocyanidines caractérisés par une très grande instabilité pouvant donner naissance à des dérivés de l'acide hydroxybenzoïque sous l'action combinée de la chaleur et de l'oxygène. L'acylation a pour effet de prévenir cette dégradation, car les glycosidases d'origine microbienne ne peuvent pas dégrader les glycosides acylés (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2009).

#### IV.5.2. Oxydation chimique

Les anthocyanes comptent parmi les flavonoïdes les moins stables sur le plan thermique. Les anthocyanidines, les aglycones correspondants, ne sont en fait stables que dans des conditions très acides et sont considérablement dégradées en moins d'une heure dans des conditions physiologiques (pH = 7.4, 37 °C) (Cabrita *et al.*, 2014; Fleschhut *et al.*, 2006).

D'après la structure des produits de dégradation, il est clair qu'une combinaison de voies hydrolytiques et autoxydantes conduit au clivage des liaisons C2–C1', C2–C3 et C3–C4 (figure 15) (Dueñas *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2007; Sadilova *et al.*, 2007).

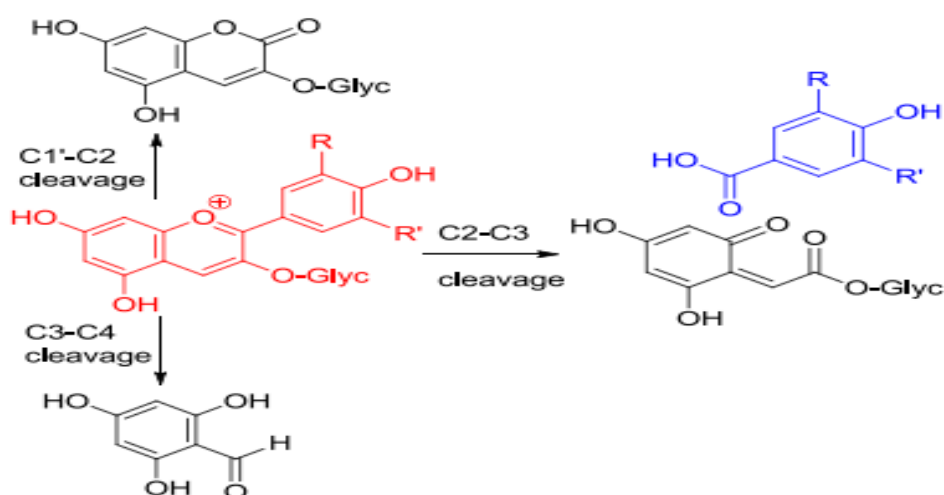
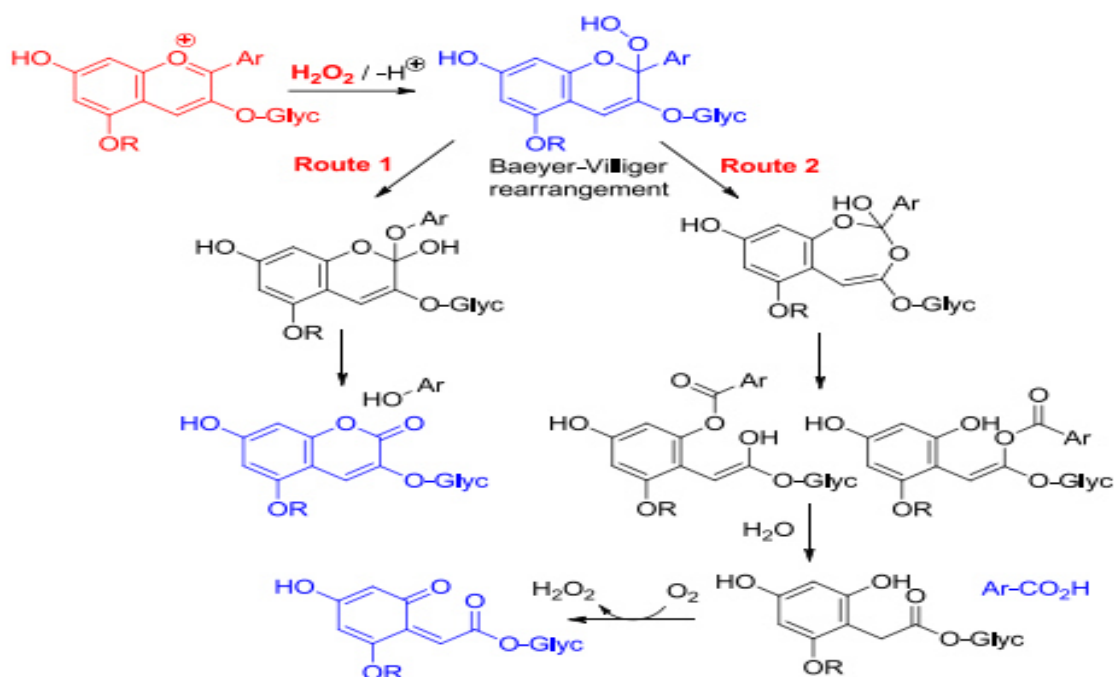


Figure 15 : Voies de dégradation des anthocyanes (Dangles et Fenger, 2018)

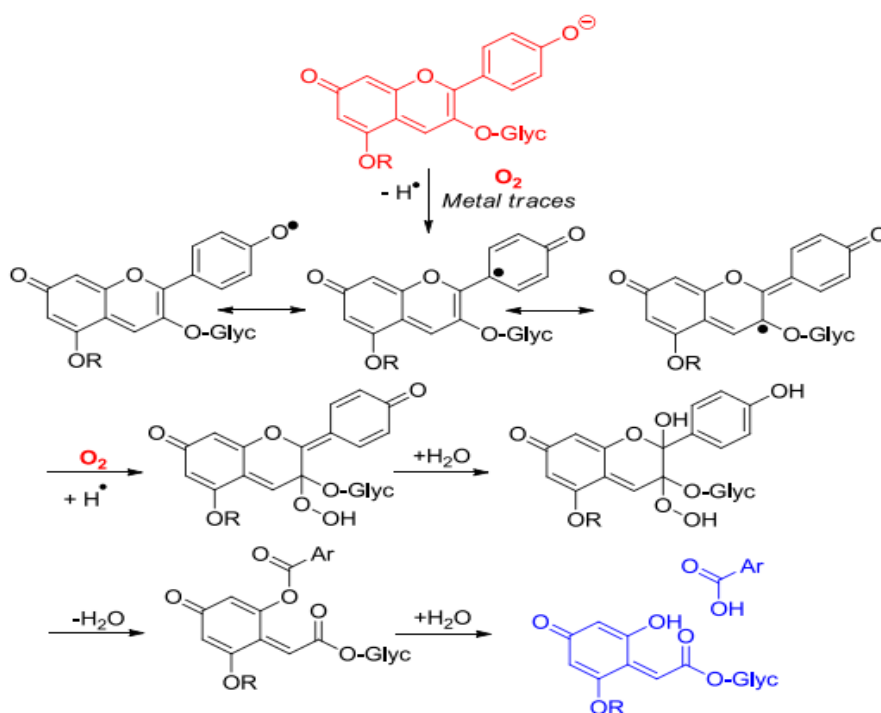


Un mécanisme impliquant le peroxyde d'hydrogène préformé peut expliquer la formation de certains produits de clivage (**figure 16**). L'étape primordial est l'ajout de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (un nucléophile fort) sur le  $\text{C}_2$  de l'ion flavylum, suivi d'un réarrangement Baeyer-Villiger, qui ouvre les voies de clivage des liaisons  $\text{C}_2\text{-C}_1'$  et  $\text{C}_2\text{-C}_3$  (**Dueñas et al., 2006 ; Lopes et al., 2007**)



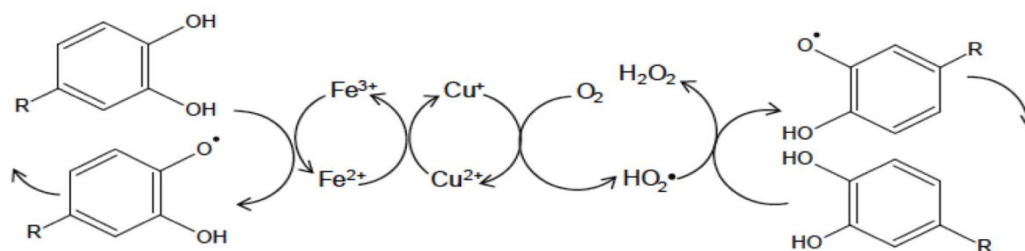
**Figure 16 :** Mécanisme de la dégradation des anthocyanes avec la préformation du peroxyde d'hydrogène (Ar = anneau catéchol) (**Dangles & Fenger, 2018**).

Cependant, la formation préliminaire de  $\text{H}_2\text{O}_2$  reste incertaine et doit impliquer l'autoxydation directe des anthocyanes. Ainsi, un mécanisme alternatif commençant par un transfert d'électron ou de proton H (médié par des traces de métaux de transition non identifiées) de la base anionique ou neutre sur l' $\text{O}_2$  délivrerait un radical fortement délocalisé qui est sensible à l'addition d' $\text{O}_2$  à différents centres. Le clivage des intermédiaires d'hydroperoxides ainsi formés pourrait également entraîner la dégradation des produits détectés (**Dangles et Fenger, 2018**).



**Figure 17:** Dégradation des anthocyanes proposé sans la préformation du peroxyde d'hydrogène (Dangles et Fenger, 2018).

L'oxydation chimique se fait également par l'intermédiaire de quinones, composés instables dont la formation est catalysée par des ions métalliques (Figure 18). La formation de ces quinones est favorisée pour les polyphénols ayant un groupement orthodihydroxybenzène (Li et al., 2008 ; Oliveira et al., 2011). La dégradation des anthocyanes par l'acide ascorbique se fait par l'intermédiaire des produits de dégradation de ce dernier. En présence d'oxygène, l'oxydation de l'acide ascorbique (oxydoréduction) entraîne la formation d'acide désoxy-ascorbique et de peroxyde d'hydrogène qui sont impliqués dans le processus de dégradation des anthocyanes (Krifi et al., 2000 ; West et al., 2013).



**Figure 18 :** Oxydation des polyphénols : formation de quinone catalysée par des ions métalliques (Beye et al, 2015)

*Encapsulation des  
anthocyanes*

## V. Encapsulation

### V.1. Définition

L'encapsulation est définie comme une technologie consistant à piéger des matériaux solides, liquides ou gazeux dans des capsules miniatures, de taille nano-, micro- ou millimétriques, qui peuvent libérer leur contenu à des vitesses contrôlées dans des conditions spécifiques (**Mishra, 2015**). Elle peut également être définie par sa taille de particules, par exemple : nanoencapsulation, microencapsulation, etc. Dans la dernière décennie, elle a été largement étudiée et de nombreuses applications sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire pour répondre aux besoins. Les avantages possibles des ingrédients microencapsulés dans l'industrie alimentaire sont résumés par **Zuidam et Shimoni, (2010)**. Comme suit :

- Praticité supérieure d'utilisation de l'agent actif (par exemple, conversion de l'agent actif en une poudre, qui peut être exempte de poussière, s'écouler librement et avoir une odeur plus neutre).
- Immobilisation des agents actifs dans les systèmes de transformation des aliments.
- Amélioration de la stabilité du produit final et pendant le traitement (c'est-à-dire moins d'évaporation de l'agent actif volatile et / ou aucune dégradation ou réaction avec d'autres composants dans le produit alimentaire tels que l'oxygène ou l'eau).
- Amélioration de la sécurité (par exemple, réduction de l'inflammabilité des substances volatiles comme l'arôme, pas de manipulation d'huile volatile concentrée).
- Création d'effets visuels et texturaux (repères visuels).
- Propriétés ajustables des composants actifs (taille des particules, structure, lipo- ou hydro-soluble, couleur).
- Masquage d'un goût indésirable.
- Libération contrôlée (différenciation, libération par le stimulus droit).

Dans l'industrie alimentaire, de nombreux procédés d'encapsulation reposent sur la réalisation en premier temps d'une dispersion fine de l'actif (sous forme gazeuse, liquide ou pulvérulente) et cette dispersion est ensuite entourée d'un matériau enrobant par différents procédés physico-chimiques (**tableau VI**).

**Tableau VI** : Principaux procédés de microencapsulation utilisés en sciences des aliments  
(Nguyen, 2018).

Procédés	Étape du procédé	Tailles des particules (µm)	Taux d'encapsulation (%)
Atomisation / séchage (spay-drying)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dispersion ou dissolution de la matière active dans une solution de matériau enrobant</li> <li>2. Atomisation</li> <li>3. Séchage</li> </ol>	1 – 400	< 50
Lyophilisation	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dispersion ou dissolution de la matière active dans une solution de matériau enrobant</li> <li>2. Congélation de l'échantillon</li> <li>3. Séchage sous basse pression</li> <li>4. Broyage (si nécessaire)</li> </ol>	20 – 5000	Variable
Coacervation	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dispersion de la matière active dans une solution aqueuse de deux polymères portant des charges opposées</li> <li>2. Ajustement du pH de la solution</li> <li>3. Coacervation : les gouttelettes de coacervat se déposent à la surface de la matière active à encapsuler et former un enrobage continu</li> <li>4. Réticulation : Cet enrobage est consolidé par réticulation des macromolécules constitutives du coacervat</li> </ol>	5 – 200	40-90

La lyophilisation est la technique la plus appropriée pour l'encapsulation des molécules thermosensibles et instables dans une solution aqueuse (Vandamme *et al.*, 2007). Elle permet une conservation à long terme grâce à l'abaissement de l'activité de l'eau du produit.

Les inconvénients majeurs de la lyophilisation sont la consommation d'énergie élevée, la longue durée de traitement. Comparé au séchage par atomisation la lyophilisation est jusqu'à 30-50 fois plus chère (**Gharsallaoui et al., 2007**).

La coacervation est un procédé couteux qui a été récemment utilisée pour l'encapsulation de qualité alimentaire (**Basharat et al., 2015**).

## **V.2. Encapsulation des anthocyanes pour les applications alimentaires**

Le problème majeur associé au stockage des anthocyanes est leur instabilité causée par la température, l'oxygène, la lumière et certaines enzymes pendant le traitement et le stockage. Les connaissances sur les interactions entre les anthocyanes et les biopolymères peuvent être appliquées pour concevoir des formulations permettant d'améliorer la stabilité chimique des anthocyanes. (**Dangles et Fenger, 2018**).

Dans des expériences simples impliquant des boissons modélisées, des solutions d'anthocyanes et de biopolymères solubles sont chauffés, et la perte de couleur ou bien la concentration résiduelle en anthocyanes est contrôlée en fonction du temps. Par exemple, les mannoprotéines de levure (0,5 % w/w pour les anthocyanes et les mannoprotéines) augmentent la demi-vie de la perte de couleur d'un facteur de 5,4 dans les expériences menées à pH = 7 et T = 80° C ou 126° C (modélisation de la pasteurisation ou de la stérilisation) (**Wu et al., 2015**)

De même, la perte de couleur dans les solutions d'anthocyanes de carottes violettes à pH = 3,0 et T = 40° C (à la lumière) s'est avérée inhibée par l'ajout de gomme arabique (0,05 à 5,0 %) avec une stabilité maximale observée à 1,5 % (50 % de rétention de couleur après 5 jours, contre 20 % dans le témoin) (**Chung et al., 2016**). Des observations similaires ont été faites avec des pectines ou des protéines de lactosérum (1 %), le meilleur résultat étant obtenu avec des protéines de lactosérum dénaturées à la chaleur (rétention de couleur de 70 % après 7 jours à 40° C, contre 20 % dans le témoin) (**Chung et al., 2015**).

L'amélioration de la stabilité implique des interactions directes entre les anthocyanes et les protéines (y compris la glycoprotéine de gomme arabique). Cependant, le mécanisme de protection demeure largement inconnu (**Dangles et Fenger, 2018**). De ces faits une approche plus sophistiquée consiste à préparer des micro- ou nanoparticules solides avec l'utilisation de polymères naturels comme matériau de revêtement pour améliorer la stabilité de l'anthocyane et pour aider à libération contrôlée de ces ingrédients fonctionnels (**Basharat et al., 2015**).

Par exemple, les nanoparticules de protéines de lactosérum et de pectine de betterave peuvent être chargées d'extraits d'anthocyanes avec une efficacité plus élevée (55 %) que lorsque des anthocyanes sont ajoutées avant formation de nanoparticules (Arroyo-Maya et al., 2015). La stabilité thermique des anthocyanes encapsulés s'est révélée largement améliorée : Dégradation de 12 % après 3 jours à 40° C, comparativement à 90 % dans le témoin (aucune particule). La même efficacité a été observée dans des échantillons exposés à la lumière blanche pendant 10 jours (-20 % contre -80 %). Les Polysaccharides sulfonfylurés, tels que le sulfate de dextrane et les carraghénanes, peuvent également être utilisés pour encapsuler les anthocyanes de myrtille à partir de solutions acides (pH 3) pour améliorer leur stabilité. (Klimaviciute et al., 2015 et Navikaite et al., 2016). Le tableau VI présente certains matériaux et techniques utilisées dans l'encapsulation des anthocyanes.

**Tableau VII :** Encapsulation d'anthocyane par certains matériaux et techniques.

Anthocyanes	Matériaux encapsulation	Techniques	Références
Anthocyane de myrtille	- Gomme arabique - Whey proteine	Spray-drying	(Flores et al., 2014)
Anthocyane de framboise	- Gélatine - Gomme arabique	Coacervation complexe	(Shaddel et al., 2017)
Anthocyane de la peau de raisin	- Maltodextrine - Gomme arabique	Lyophilisation	(Stoll et al., 2016).
Anthocyanes de de pétales de safran	- Gomme de graines de Cress ( <i>Lepidium sativum</i> ) - Gomme arabique	Lyophilisation	(Jafari et al., 2016) .
Anthocyane d'hibiscus.	maltodextrine, pectine, gélatine, protéines du lactosérum, carraghénane et gomme arabique	Spray-drying	(Díaz-Bandera et al., 2015).

**Idham et al., (2012)** ont observé que la microencapsulation des anthocyanes avec une combinaison de maltodextrine et de gomme arabique a permis d'obtenir les meilleures performances d'encapsulation ( $99.87 \pm 0.04\%$ ) avec une augmentation de la durée de conservation et une perte de couleur faible des pigments (Hibiscus) (**Basharat et al., 2015**).



# *Conclusion*

## Conclusion

La couleur des aliments est un sujet qui a suscité un intérêt de longue date autant chez les producteurs que chez les consommateurs (**Jacquot et al., 2011**). La nature nous offre une merveilleuse diversité de végétaux et une palette de couleurs incroyables (rouge, bleue et violet), Parmi les pigments naturels retrouvés chez les végétaux les anthocyanes (**Nguyen, 2018**).

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification des anthocyanes, l'extraction. L'extraction par solvant est la procédure la plus commune pour extraire les anthocyanes elle utilise des solvants tels que le méthanol ou l'éthanol avec différentes proportions d'acide chlorhydrique (HCl 0.1- 1%). L'utilisation d'un solvant organique a l'avantage d'inactiver les enzymes présentes dans les tissus végétaux et de faciliter le traitement subséquent de l'extrait obtenu, car il est facilement évaporé (**Escribano-Baillon et Santos-Buelga, 2003**). Cependant, ces procédés sont généralement longs, fastidieux et nécessitent de grande quantité de solvant organique (**Michel, 2011**). Pour une extraction des composés d'origine alimentaire, il est préférable d'utiliser l'éthanol car il est moins toxique, bien qu'il soit moins efficace dans l'extraction et plus difficile à éliminer plus tard (**Emile, 2010**). Ces dernières années ont été marquées par le développement de méthodes d'extraction alternatives qui font intervenir des fluides supercritiques, ou des techniques comme l'extraction assistée par ultra-sons et l'extraction assistée par micro-ondes. Ces techniques offrent de nombreux avantages d'un point de vue du temps d'extraction, de la consommation de solvant, du rendement d'extraction et de la reproductibilité, et ce sans altérer la qualité de l'extrait (**Michel, 2011**). De plus, ces techniques sont simples d'utilisations, automatiques et souvent plus sélectives. (**Papagiannopoulos et al., 2002 ; Zhang et al., 2011**).

Plusieurs techniques de dosage et de caractérisation ont été utilisées pour obtenir des informations structurales nécessaire afin d'identifier les anthocyanes. Celles-ci incluent les méthodes spectrales et chromatographiques. Cependant le couplage des techniques spectroscopiques moléculaires avec les techniques chromatographiques constitue les meilleures méthodes d'analyse quantitative et qualitative des anthocyanes (**Emile, 2010**).

Comme la plupart des colorants naturels, les anthocyanes sont instables mais stables dans des conditions acides. Les principaux facteurs influençant la stabilité des anthocyanes sont le pH, la température et la présence d'oxygène et de la lumière, mais la dégradation

enzymatique et les interactions avec des composants alimentaires (par exemple l'acide ascorbique, les ions métalliques, les sucres, les copigments) ne sont pas moins importantes.

L'utilisation des pigments anthocyaniques dans les aliments a été entravée par leur faible stabilité et, à son tour, leur incorporation dans les aliments et les produits médicaux semble être une tâche difficile. L'encapsulation semble être un moyen efficace d'introduire de tels composés dans ces produits. Les agents encapsulants agissent comme une couche protectrice contre les conditions ambiantes défavorables, telles que la lumière, l'humidité et l'oxygène. (**Basharat et al., 2015**).

# *Références*

**A**

- Abdel-Aal E-S M. Hucl P et Rabalski I. 2018. Compositional and antioxidant properties of anthocyanin-rich products prepared from purple wheat. *Food Chemistry*, 254: 13-19.
- Achat S. Tomao V. Madani K. Chibane M. Elmaataoui M. Dangles O. et Chemat F. 2012. Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale. *Ultrasonics sonochemistry* 19 : 777-786.
- Ali-Rachedi F. Meraghni S, Touaibia N. et Sabrina M. 2018. Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L. *Bulletin de la société royale des sciences de liège* 87 : p. 13 -21.
- Alvarez-Suarez J M. Giampieri F. Tulipani S. Casoli T. Di Stefano G. González-Paramás A M. Santos-Buelga C. Busco F. Quiles J L. Cordero M D. Bompadre S. Mezzetti B. et Battino M. 2014. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 25: 289-294.
- Amarowicz R. Carle R. Dongowski G. Durazzo A. Galensa R. Kammerer D. Maiani G. et Piskula M K. 2009. Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53: 151-183.
- Azmir J. Zaidul I S M. Rahman M M. Sharif K M. Mohamed A. Sahena F. Jahurul M H A. Ghafoor K. Norulaini N A N. et Omar A K M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117: 426-436.

**B**

- Baranac J M. Petranović N A. et Dimitrić-Marković J M .1997. Spectrophotometric Study of Anthocyan Copigmentation Reactions. 2. Malvin and the Nonglycosidized Flavone Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:1694-1697.
- Basharat Y, Khalid G, Ali Abas W. et Preeti Singh. 2015. Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems : A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-32.
- Ben Amor B. (2008). Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs : texturation par détente instantanée contrôlée. Thèse de doctorat Génie des Procédés Industriels. Université de la Rochelle, 187p.
- Berg S. Bretz M. Hubbermann E M. et Schwarz K. 2012. Influence of different pectins on powder characteristics of microencapsulated anthocyanins and their impact on drug retention of shellac coated granulate. *Journal of Food Engineering*, 108:158-165.
- Beye C. Tounkara LS. Seck MA. Thonart P. et Fickers .2015. Opportunités pour la valorisation des végétaux riches en anthocyanes comme sources de colorants alimentaires (synthèse bibliographique). *Biotechnol Agron Société Environ*, 19 :392–401.
- Bloor S J. et Falshaw R. 2000. Covalently linked anthocyanin-flavonol pigments from blue *Agapanthus* flowers. *Phytochemistry*, 53:575-579.

Boulekbache-Makhlouf L. Medouni L. Medouni-Adrar S. Arkoub L. et Madani K.2013. Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. *Industrial Crops and Products*, 49: 668-674.

Boulton R.2001.The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52 : 67–87.

Brooks M S-L. et Celli G B. 2019. *Anthocyanins from Natural Sources: Exploiting Targeted Delivery for Improved Health*. Royal Society of Chemistry.

Brouillard R. 1981.Origin of the exceptional colour stability of the Zebrina anthocyanin. *Phytochemistry*, 22:1311-1323.

Burton-Freeman B. Sandhu A. et Edirisinghe I.2016. Chapter 35—Anthocyanins. In R. C. Gupta (Éd.), *Nutraceuticals* (p. 489-500).

## C

Cabrita L. Petrov V. et Pina F. 2014. On the thermal degradation of anthocyanidins: Cyanidin. *RSC Advances*, 4: 18939-18944.

Camel V. 2001. Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126: 1182-1193.

Carvalho F B. Gutierrez J M. Bohnert C. Zago A M. Abdalla F H. Vieira J M. Palma H E. Oliveira S M. Spanevello R M. Duarte M M. Lopes S T A. Aiello G. Amaral M G. Pippi N L. et Andrade C M. 2015. Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 26: 378-390.

Castañeda-Ovando A. Pacheco-Hernández M d L. Páez-Hernandez M E. Rodríguez J A. et Galán-Vidal C A.2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113:859-871.

Chandrasekhar J. Madhusudhan M C.et Raghavarao K S M S.2012. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 615-623.

Chen M.Zhao Y. et Yu S.2015. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses.*Food Chemistry*, 172:543-550.

Chiang A N. Wu H L. Yeh H I.Chu C S. Lin H C. et Lee W C.2006. Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities. *Lipids*, 41:797-803.

Chung C. Rojanasasithara T. Mutilangi W. et McClements D J. 2016. Stabilization of natural colors and nutraceuticals: Inhibition of anthocyanin degradation in model beverages using polyphenols. *Food Chemistry*, 212: 596-603.

Cruz L. Petrov V. Teixeira N. Mateus N. Pina F. et Freitas V. 2010. Establishment of the Chemical Equilibria of Different Types of Pyranoanthocyanins in Aqueous Solutions: Evidence for the Formation of Aggregation in Pyranomalvidin-3-O-coumaroylglucoside- (+)-catechin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114: 13232-13240.

## *D*

Dangles O. Et Fenger J A.2018. The Chemical Reactivity of Anthocyanins and Its Consequences in Food Science and Nutrition. *Molecules*, 23 : 1970.

Dangles O. Sait N. et Brouillard R.1993. Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*, 34 :119-124.

Demirdöven A. Özdoğan K. et Erdoğan-Tokatlı K.2015. Extraction of Anthocyanins from Red Cabbage by Ultrasonic and Conventional Methods: Optimization and Evaluation: Extraction of Red Cabbage Anthocyanins by UE and CE Methods. *Journal of Food Biochemistry*, 39: 491-500.

De Pascual-Teresa S. Moreno D A. et García-Viguera C. 2010. Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11 :1679-1703.

Di Meo F. Sancho Garcia J C. Dangles O.,et Trouillas P.2012. Highlights on Anthocyanin Pigmentation and Copigmentation : A Matter of Flavonoid  $\pi$ -Stacking Complexation To Be Described by DFT-D. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8: 2034-2043.

Dranca F. et Oroian M.2017. Total Monomeric Anthocyanin, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Extracts from Eggplant (*Solanum Melongena* L.) Peel Using Ultrasonic Treatments: Eggplant antioxidants extraction. *Journal of Food Process Engineering*, 1745-4530.

Dueñas M. Fulcrand H. et Cheynier V. 2006. Formation of anthocyanin–flavanol adducts in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, 563 : 15-25.

## *E*

El darra N. (2013). Les composés phénoliques des raisins : étude du potentiel qualitatif et des procédés émergents d'extraction, Thèse de Génie des Procédés Industriels et développement durable. Université de technologie compiegne , 344p.

Nave F. Petrov V. Pina F. Teixeira N. Mateus N. et Freitas V. (2010). Thermodynamic and Kinetic Properties of a Red Wine Pigment: Catechin-(4,8)-malvidin-3-O-glucoside. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114 : 13487-13496.

Emile N E. (2010). Identification des anthocyanes de deux especes de bleuets Sauvages du québec « *vaccinium myrtilloides* » et évaluation de leur potentiel antioxydant. thèse de doctorat. Université Laval QUEBEC ,187p.

Escribano-Baillon M T. Santos-Buelga C J.2003. Analysis of polyphenols. In *Methods in Polyphenols Analysis*, edited by Santos-Buelga, C; Williamson, G.

**F**

Ferarsa S. Zhang W. Moulai-Mostefa N. Ding L. Jaffrin M Y. et Grimi N. 2018. Recovery of anthocyanins and other phenolic compounds from purple eggplant peels and pulps using ultrasonic-assisted extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 109: 19-28.

Fleschhut J. Kratzer F. Rechkemmer G. et Kulling S E. 2006. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European journal of nutrition*, 45:7–18.

Flores F P. Singh R K. Kerr W L. Pegg R B. et Kong F. 2014. Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 153: 272-278.

**G**

Galván D'Alessandro L. Dimitrov K. Vauchel, P. et Nikov I. 2014. Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*. 92: 1818-1826.

Ganapathi P. Madhusudhan M C. Ravindra B B. Raghavarao K S M S. 2009 Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish, 48 :364–369.

Gaskell S J. 1997. Electrospray: Principles and Practice. *J. Journal of Mass Spectrometry*, 32: 677-688.

Ghafoor K. Park J. et Choi Y H. 2010. Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B) peel by using response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 11: 485-490.

Gharsallaoui A. Roudaut G. Chambin O. Voilley A. et Saurel R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40: 1107-1121.

Ghavidell R A. Sheikholeslami Z. Ahmadi S. 2015. Optimization of extraction the red cabbage extract with ultrasound technology, assisted by response surface method. *International journal of bioscience*, 3:94-100.

Giusti M M. et Wrolstad R E. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their application in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14: 217-225.

Gowd V. Jia Z. et Chen W. 2017. Anthocyanins as promising molecules and dietary bioactive components against diabetes – A review of recent advances. *Trends in Food Science & Technology*, 68: 1-13.

Guimarães R. Barros L. Calhêla R C. Carvalho A M. Queiroz M J R P. et Ferreira I C F R. 2014. Bioactivity of Different Enriched Phenolic Extracts of Wild Fruits from Northeastern Portugal: A Comparative Study. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69: 37-42.

Gupta P. Sreelakshmi Y. et Sharma R. 2015. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods*, 1-12.



**H**

He F. Liang N N. Mu L. Pan Q H. Wang J. Reeves M J. et Duan C Q.2012. Anthocyanins and their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17:1571-1601.

He J. et Giusti M M. 2010. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1: 163–187.

Hong H T. Netzel M E. et O'Hare, T. J.2020. Optimisation of extraction procedure and development of LC–DAD–MS methodology for anthocyanin analysis in anthocyanin-pigmented corn kernels. *Food Chemistry*, 319:126515.

**I**

Idham Z. Muhamad I I.Et Sarmidi M R. 2012. Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from hibiscus sabdariffa L. *Journal of Food Process Engineering*. 35: 522–542.

**J**

Jacquot M., Voilley A., et Fagot ,P. 2011. *La couleur des Aliments, de la théorie à la pratique*.pp.76

Jafari S M. Mahdavi-Khazaei K. et Hemmati-Kakhki A.2016. Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with Arabic gum through freeze drying. *Carbohydrate Polymers*, 140 : 20-25.

Jiao Y. Zhang Y.He Z. Zhai W. Gong H. et Yang Z.2016. Effect of Ferulic Acid on the Formation of Pyranoanthocyanins from Purple Corn (*Zea mays* L) Cob in a Model System and Their Effects on Color. *International Journal of Food Properties*, 19: 847-858.

Jing P. Zhao S J. Ruan S Y. Xie Z H. Dong Y. et Lucy Yu L. 2012. Anthocyanin and glucosinolate occurrences in the roots of Chinese red radish (*Raphanus sativus* L.), and their stability to heat and pH. *Food Chemistry*, 133:1569–1576.

**K**

Kader F. Irmouli M. Nicolas J P. et Metche M.2001. Proposed mechanism for the degradation of pelargonidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone. *Food Chemistry*, 75: 139-144.

Kader F, Irmouli M. Zitouni N. Nicolas J P. et Metche M. 1999. Degradation of Cyanidin 3-Glucoside by Caffeic Acid o -Quinone. Determination of the Stoichiometry and Characterization of the Degradation Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4625-4630.

Karthikeyan K. Bai B R S. et Devaraj S N. 2007. Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *International Journal of Cardiology*, 115: 326-333.

Kasote D M. Duncan G J. Neacsu M. Russell W R. 2019. Rapid method for quantification of anthocyanidins and anthocyanins in human biological samples. *Food Chemistry*. 290 :56–63.

Kaufmann B. et Christen P. 2002. "Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction." *Phytochemical Analysis* 13: 105-113.

Kong J M. Chia L S. Goh N K. Chia T F. et Brouillard R.2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64: 923-933.

Kosir J. Et Kidric J.2002. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. *Anal. Chim. Acta*, 458:77-84.

## L

Lala G. Malik M. Zhao C. He J. Kwon Y. Giusti M. Magnuson B.2006. Anthocyanin-rich extracts inhibit multiple biomarkers of colon cancer in rats. *Nutr. Canc.* 54: 84–93.

Lee J. Rae Kim Y. Gyu Song I. Ha S J. Eon Kim Y. Baek N I. et Kee Hong E. 2014. Cyanidin-3-glucoside isolated from mulberry fruit protects pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative stress-induced apoptosis. *International journal of molecular medicine*, 35:405-412.

Leong S Y. Burritt D J. et Oey I.2016. Evaluation of the anthocyanin release and health-promoting properties of Pinot Noir grape juices after pulsed electric fields. *Food Chemistry*, 196: 833-841.

Liang Y. Chen J. Zuo Y. Ma K Y. Jiang Y. Huang Y. et Chen Z Y.2013. Blueberry anthocyanins at doses of 0.5 and 1 % lowered plasma cholesterol by increasing fecal excretion of acidic and neutral sterols in hamsters fed a cholesterol-enriched diet. *European Journal of Nutrition*, 52: 869-875.

Li C Y. Kim H W. Won S. Min H K. Park K J. Park J Y. Ahn M S. et Rhee H I.2008. Corn Husk as a Potential Source of Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:11413-11416.

Li L. Wang L. Wu Z. Yao L. Wu Y. Huang L. Liu K. Zhou X. et Gou D. 2014. Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis. *Scientific Reports*, 4: 6234.

Lopes P. Richard T. Saucier C. Teissedre P L. Monti. J P. et Glories Y. 2007. Anthocyanone A: A Quinone Methide Derivative Resulting from Malvidin 3-O-Glucoside Degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 2698-2704.

## M

Malaj N. De Simone B C. Quartarolo A D. et Russo N. 2013. Spectrophotometric study of the copigmentation of malvidin 3-O-glucoside with p-coumaric, vanillic and syringic acids. *Food Chemistry*, 141: 3614-3620.

Mateus N. Pascual-Tesesa S. Rivas-Gonzalo J C. Santos-Buelga C. Freits V.2002. Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines. *Food Chemistry*, 76 :335-342.

Michel T. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse de doctorat de Chimie Analytique – Phytochimie université d'Orléans 286p.

Mishra, M. 2015. Handbook of Encapsulation and Controlled Release: Taylor & Francis. pp. 1544.

Mohammad Fauzi A H. et Amin N A S. 2012. An overview of ionic liquids as solvents in biodiesel synthesis. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16: 5770-5786.

### N

Netramail S. Thitisilp K. Hayati S. et Sittiwat L. 2019. Enhanced Extraction of Anthocyanins from Red Cabbage (*Brassica oleracea*) Using Microwave Assisted Extraction. future foode innovation for better health and wellness.

Nguyen T T. (2018). Éco-extraction et encapsulation de pigments caroténoïdes et anthocyanes à partir de plantes tropicales. Thèse de doctorat en Biotechnologie Agro-alimentaire. Université Bourgogne-Franche-Comté, 145p.

### O

Oancea A M. Onofrei C. Turturică M. Bahrim G. Râpeanu G. et Stănciuc N. 2018. The kinetics of thermal degradation of polyphenolic compounds from elderberry (*Sambucus nigra* L.) extract. Food Science and Technology International = Ciencia Y Tecnologia De Los Alimentos Internacional, 24: 361-369.

Ojeda D. Jiménez-Ferrer E. Zamilpa A. Herrera-Arellano A. Tortoriello J. et Alvarez L. 2010. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. Journal of Ethnopharmacology, 127: 7-10.

Oliveira J. Petrov V. Parola A J. Pina F. Azevedo J. Teixeira N. Brás N F. Fernandes P A. Mateus N. Ramos M. J. et de Freitas V. 2011. Chemical Behavior of Methylpyranomalvidin-3-O-glucoside in Aqueous Solution Studied by NMR and UV-Visible Spectroscopy. The Journal of Physical Chemistry B, 115: 1538-1545.

Olivia RL W. Anh Dao T P. Hung T H. Gabriele N. Yasmina S. et Michael E N. 2020. Bioactive Anthocyanins in Selected Fruits – A Foodomics Approach, 3-28.

### P

Pap N. Sándor B. Eva P. Liisa M. Miklòsnè G. Ernó G. Cecília H. Riitta L. et Keiski. 2012. Microwave-Assisted Extraction of Anthocyanins from Black Currant Marc. Food Bioprocess Technol.

Paes J. Dotta R. Barbero G F. and Martínez J. 2014. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized liquids. The Journal of Supercritical Fluids, 95: 8-16.

Papagiannopoulos M. Zimmermann B. Mellenthin A. Krappe M. Maio G. et Galensa R. 2002. Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-

performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt. *Journal of Chromatography A*, 958: 9-16.

Pap N. Beszédes S. Pongrácz E. Myllykoski L. Gábor M. Gyimes E. Hodúr C. et Keiski R. 2013. Microwave-Assisted Extraction of Anthocyanins from Black Currant Marc. *Food and Bioprocess Technology*. 6: 2666-2674.

Patel S. 2014. Hibiscus sabdariffa: An ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4 :23-27.

Patras A. Brunton N P. O'Donnell C. et Tiwari B K. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 3-11.

Paula J T. Paviani L C. Foglio M A. Sousa I M O. et Cabral F A. 2013. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>/ethanol/water mixtures as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*. 81: 33-41.

Pétrier C. Gondrexon N. Boldo P. 2008. Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur*.

Prior R L. et Wu X. 2012. Analysis Methods of Anthocyanins. In Z. Xu & L. R. Howard (Éds.), *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*. Wiley-Blackwell, 149-180.

Pina F. 2014. Chemical Applications of Anthocyanins and Related Compounds. A Source of Bioinspiration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 6885-6897.

Pina F. Melo M J. Laia C A T. Parola A J. Et Lima J C. 2012. Chemistry and applications of flavylum compounds: A handful of colours. *Chem. Soc. Rev.*, 41: 869-908.

## **R**

Rahman M M. Ichiyanagi T. Komiyama T. Hatano Y. Konishi T. 2006. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Radic. Res.* 40: 993–1002.

Ravanfar R. Tamadon A M. Et Niakousari M. 2015. Optimization of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from red cabbage using Taguchi design method. *Journal of Food Science and Technology*, 52: 8140-8147.

Riso P. Klimis-Zacas D. Del Bo C. Martini D. Campolo J. Vendrame S. Møller P. Loft S. De

Maria R. Et Porrini M. 2013. Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *European Journal of Nutrition*, 52 : 949-961.

Rodriguez-Amaya D B. 2019. Update on natural food pigments—A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, 124: 200-205.

Routray W. et Orsat V. 2019. Microwave Assisted Extraction of Flavonoids: A Comprehensive Overview. *Food Bioprocess Technol*,5:409-424.

## S

Sadilova E. Stintzing F C. et Carle R. 2006. Thermal Degradation of Acylated and Nonacylated Anthocyanins, *Journal of Food Science*, 71: 504-512.

Seabra I J. Braga M E M. Batista M T. et de sousa H C.2010.Effect of solvent (CO<sub>2</sub>/ethanol/H<sub>2</sub>O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *The journal of Supercritical Fluids*, 54:145-152.

Sadilova, Eva, Carle, R., & Stintzing, F. C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(12), 1461-1471.

Shaddel R. Hesari J. Azadmard-Damirchi S. Hamishehkar H. Fathi-Achachlouei B. et Huang Q.2017. Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules* 24:20818-20825.

Silva S. Em C. Calhau C. Rm M.Et Me P. 2015 Anthocyanin Extraction from Plant Tissues: A Review ,1-52.

Silva V O. Freitas A A. Maçanita A L. et Quina F H.2016. Chemistry and photochemistry of natural plant pigments : The anthocyanins. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 29: 594-599.

Silva S. Costa E M. Calhau C. Morais R M. et Pintado M E.2017. Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57: 3072-3083.

Sinela A M. Mertz C. Achir N. Rawat N. Vidot K. Fulcrand H. et Dornier M.2017. Exploration of reaction mechanisms of anthocyanin degradation in a roselle extract through kinetic studies on formulated model media. *Food Chemistry*, 235:67-75.

Smeriglio A. Barreca D. Bellocco E. et Trombetta D.2016. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy Research*, 30: 1265-1286.

Stoll L. Costa T M H. Jablonski A. Flôres S H.Et de Oliveira Rios A. 2016. Microencapsulation of Anthocyanins with Different Wall Materials and Its Application in Active Biodegradable Films. *Food and Bioprocess Technology*, 9: 172-181.

Strack D. Wray V. 1998. In *Methods in Plants Biochemistry*, Academic Press, New York, 325.

Sun J. Bai W. Zhang Y. Liao X. et Hu X.2011. Identification of degradation pathways and products of cyanidin-3-sophoroside exposed to pulsed electric field. *Food Chemistry*, 126: 1203-1210.

## T

Teng H. Fang T. Lin Q. Song H. Liu B. et Chen L. 2017. Red raspberry and its anthocyanins: Bioactivity beyond antioxidant capacity. *Trends in Food Science & Technology*, 66 : 153-165.

Tiên DO T K.2016. Evaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPLC) dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels. Thèse en chimie. L'université Nice-Sophia Antipolis 183p.

Timberlake C F. et Bridle P.1967.Flavylium salts, anthocyanidins and anthocyanins. I.—Structural transformations in acid solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18: 473-478.

Todaro A.Cimino F. Rapisarda P. Catalano A. Barbagallo R. et Spagna G. 2009. Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*, 114: 434-439.

Trikas E D. Papi R M. Kyriakidis D A. et Zachariadis G A. 2016. A Sensitive LC-MS Method for Anthocyanins and Comparison of Byproducts and Equivalent Wine Content. *Separations*, 3 : 18.

Trouillas P. Sancho-García J C. De Freitas V. Gierschner J. Otyepka M. et Dangles O. 2016. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation : Insights from Theory and Experiment. *Chemical Reviews*, 116: 4937-4982.

Turker N. Aksay S. et Ekiz H I. 2004. Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) beverage: Shalgam. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52: 3807-3813.

## V

Valls J. Millan S. Mart i M.P. Borrás E. et Arola L. 2009.Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromathography A* ,1216 :7143-7172.

Vandamme T. Poncelet D. Et Subra\_Paternault P. 2007. Microencapsulation : des sciences aux technologies : Ed. Tec & Doc.

Veillet S. Tomao V. Chemat F. 2009. Ultrasound Assisted Extraction of aromas and antioxidants. in F. Chemat (Ed) *Essential oil and aromas green extractions and applications*. Handbook New Delhi Inde.

## W

Wallace T. C. et Giusti M. 2013. *Anthocyanins in Health and Disease*. Taylor & Francis Group.pp.368.

Walter M. Marchesan E. Massoni P F S. da Silva L P. Sartori G M S. Et Ferreira R B. 2013. Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. *Food Research International*, 50: 698-703.

Wang L. Weller C L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol*, 17: 300-312.

Wrolstad R E. 2006. Anthocyanin Pigments-Bioactivity and Coloring Properties. *Journal of Food Science*, 69: 419-425.

Wu C H. Huang C C. Hung C H. Yao F Y. Wang C J. et Chang Y C. 2016. Delphinidin-rich extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. trigger mitochondria-derived autophagy and necrosis through reactive oxygen species in human breast cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 25:279-290.

## Y

Yan F. et Zheng X. 2017. Anthocyanin-rich mulberry fruit improves insulin resistance and protects hepatocytes against oxidative stress during hyperglycemia by regulating AMPK/ACC/mTOR pathway. *Journal of Functional Foods*, 30: 270-281.

Yang M. Koo S I. Song W O. Chun O K. 2011. Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: review. *Curr. Med. Chem*, 18: 291–300.

Yonekura-Sakakibara K., Nakayama T., Yamazaki M. et Saito K. 2009. Modification and Stabilization of Anthocyanins. In C. Winefield, K. Davies, & K. Gould (Éds.), *Anthocyanins : Biosynthesis, Functions, and Applications*. pp. 169-190.

Youxi Y. Li-Wei C. et Li L. 2009. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage 230:1141–1153.

## Z

Zermane A. 2010. Etude de l'extraction supercritique application aux systemes agroalimentaires de Genie des procédés université Mentouri de Constantine p 136.

Zhang Y. Liu C. Yu M. Zhang Z. Qi Y. Wang J. Wu G. Li S. Yu J. Et Hu Y. et 2011. Application of accelerated solvent extraction coupled with high-performance counter-current chromatography to extraction and online isolation of chemical constituents from *Hypericum perforatum* L. *Journal of Chromatography A*, 1218: 2827-2834.

Zhang Y. Sun Y. Zhang H. Mai Q. Zhang B. Li H. et Deng Z. 2020. The degradation rules of anthocyanins from eggplant peel and antioxidant capacity in fortified model food system during the thermal treatments. *Food Bioscience*, 100701.

Zuidam N J. et Shimoni , E. 2010. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing New York, NY. Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In N. J. Zuidam & V. Nedovic (Eds.), Springer New York (pp. 3-29).

**Résumé**

La couleur est un attribut important pour accroître l'acceptabilité des produits alimentaires. Cependant l'utilisation des anthocyanes comme colorants alimentaires et ingrédients fonctionnels est limité par leur faible stabilité chimique et leurs interactions avec d'autres composés dans la matrice alimentaire. De plus, les processus de traitement thermique ainsi que le stockage peuvent générer des pertes de teneur en anthocyanes dans le produit final et provoquer des modifications de la couleur initiale. La dégradation des anthocyanes met en jeu des mécanismes très complexes. Actuellement, la plupart des recherches sur les anthocyanes se concentrent sur la résolution de ces problèmes, ainsi que sur leur purification et leur identification. Dans ce présent travail nous avons rapportés des généralités sur les anthocyanes, une synthèse des différents travaux liés à l'extraction, à la détermination, réactivité chimique et à l'encapsulation des anthocyanes.

**Les mots clés :** Anthocyanes, Extraction, Détermination, Stabilité, Encapsulation.

**Abstract**

Color is an important attribute to increase the acceptability of food products. However, the use of anthocyanins as food colorants and functional ingredients is limited by their poor chemical stability and interactions with other compounds in the food matrix. In addition, heat treatment processes, as well as storage can generate losses of anthocyanin content in the final product and cause changes in the initial color. The degradation of anthocyanins involves very complex mechanisms. Currently, most research on anthocyanins is focused on solving these problems, as well as their purification and identification. This present work is aimed to provide the current knowledge in anthocyanins, discuss different extraction and dosage techniques, their chemical reactivity and their application in food science.

**Keywords:** Anthocyanins, Extraction, Determination , Stability, Encapsulation.