



HAL
open science

Etude des mécanismes réactionnels et des cinétiques de dégradation des anthocyanes dans un extrait d'Hibiscus sabdariffa L.

André Mundombe Sinela

► **To cite this version:**

André Mundombe Sinela. Etude des mécanismes réactionnels et des cinétiques de dégradation des anthocyanes dans un extrait d'Hibiscus sabdariffa L.. Sciences agricoles. Montpellier SupAgro, 2016. Français. NNT : 2016NSAM0036 . tel-01580166

HAL Id: tel-01580166

<https://theses.hal.science/tel-01580166>

Submitted on 1 Sep 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

**Délivré par MONTPELLIER SUPAGRO
CENTRE INTERNATIONAL D'ÉTUDES
SUPÉRIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
et de l'Unité Mixte de Recherche QualiSud**

**Spécialité : Biochimie et physicochimie
alimentaire**

Présentée par André Mundombe SINELA

**ÉTUDE DES MÉCANISMES RÉACTIONNELS ET
DES CINÉTIQUES DE DÉGRADATION DES
ANTHOCYANES DANS UN EXTRAIT
D'*HIBISCUS SABDARIFFA* L.**

Soutenue le 16 Décembre 2016 devant le jury composé de

Mme Claire DUFOUR, Chargé de recherche, INRA	Rapporteur
M. Sylvain GUYOT, Directeur de recherche, INRA	Rapporteur
Mme Chantal MENUT, Professeur, Université de Montpellier	Examinatrice
Mme Hélène FULCRAND, Directeur de recherche, INRA	CoDir. de thèse
M. Manuel DORNIER, Professeur, Montpellier SupAgro	Dir. de thèse
Mme Nawel ACHIR, Maître de conf., Montpellier SupAgro	Invité
M. Christian MERTZ, Chercheur, CIRAD	Invité

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

**Délivré par MONTPELLIER SUPAGRO
CENTRE INTERNATIONAL D'ÉTUDES
SUPÉRIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
et de l'unité mixte de recherche QualiSud**

Spécialité : Biochimie et physicochimie alimentaire

Présentée par André Mundombe SINELA

**ÉTUDE DES MÉCANISMES RÉACTIONNELS
ET DES CINÉTIQUES DE DÉGRADATION DES
ANTHOCYANES DANS UN EXTRAIT
D'*HIBISCUS SABDARIFFA* L.**

Soutenue le 16 Décembre 2016 devant le jury composé de

Mme Claire DUFOUR, Chargé de recherche, INRA

M. Sylvain GUYOT, Directeur de recherche, INRA

Mme Chantal MENUT, Professeur, Université de Montpellier

Mme Hélène FULCRAND, Directeur de recherche, INRA

M. Manuel DORNIER, Professeur, Montpellier SupAgro

Mme Nawel ACHIR, Maître de conf., Montpellier SupAgro

M. Christian MERTZ, Chercheur, CIRAD

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

CoDir.de thèse

Dir. de thèse

Invité

Invité

In memoriam

Raúl Próspero SINELA “Raúl Trolão”

Manuel Francisco XAVIER “Tuliné”

à ma chérie,

à mes parents,

à mes frères et sœurs,

à mes amis,

***pour le soutien qu'ils m'ont apporté et pour leur présence tout au long de ces
années.***

Remerciements

Ce travail a abouti grâce aux cofinancements apportés par le gouvernement Angolais auprès de l'institut National de Gestion de Bourse d'Etude (INAGBE-Angola) et par le gouvernement français auprès du Ministère des Affaires Etrangères que je remercie très sincèrement.

Le présent travail a été réalisé au sein des laboratoires de l'UMR Qualisud au CIRAD. Je voudrais donc remercier la direction du CIRAD en particulier le Dr Dominique PALLET pour m'avoir reçu dans ses laboratoires et soutenu durant ces trois années.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Toutes mes reconnaissances à mon Professeur et directeur de thèse le Pr Manuel DORNIER pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être mon Directeur de Thèse. La pleine confiance qu'il m'a accordée, sa présence, sa disponibilité, son soutien, son aide, ses conseils, son appui scientifique, son amitié et surtout son charisme et ses compétences ont été très importants non seulement pour l'élaboration de ce travail mais aussi pour ma formation académique depuis l'Angola et le Master en France.

Je remercie grandement Nawel ACHIR pour m'avoir encadré tout au long de ma formation académique et professionnelle depuis le projet AngoSup, pour m'avoir formé pas à pas, pour m'avoir transmis tout son savoir avec beaucoup de rigueur, de responsabilité et de patience. La sympathie, l'empathie, l'altruisme et la compétence sont des qualités qui ne passent jamais inaperçues. Merci Nawel !

J'adresse mes chaleureux remerciements et toute ma grande reconnaissance à Christian MERTZ pour son encadrement au CIRAD, pour m'avoir formé avec beaucoup de patience, rigueur et compétence. Ta bonne humeur, ton encouragement et ta disponibilité au quotidien sont inoubliables. Chapeau grand maître !

J'exprime ma sincère gratitude à Mme Hélène FULCRAND pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de codiriger la thèse avec son appui scientifique. Merci encore pour l'appui scientifique de Mr Olivier DANGLES et Mme Alexia PRADES.

Une thèse en alternance avance bien quand on a des bons stagiaires. Merci à Kévin et Nadirah pour leur contribution dans cette thèse.

Je tiens à remercier tous mes amis, collègues et stagiaires, Adams, Paco, Chatulica, Palo, Dos Anjos, Lafayete, Jojo, Ilunga, Bettencourt, Osvaldo, Ornelas, Mussole, Elias, Famososo, Tchoca, Débora, Anastacia, Tiofilo, Osleide, Anisia, Matondo, Ualace, Camila, Jéssica, Romane, Dora, Meltem, Fanny, Auriane, Adeline, Laura, Felicitas, Carla, Didier-Axel, Brice, Tagro, Léthicia, Koumba, Larissa, Adriana, Osleide, Anisia, Matondo, Ualace, François, Vicran, Lucelia, Nirina, Abdoulaye et Mauro. Je garderai d'eux le souvenir des moments amicaux qu'on a vécu.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe et plus précisément : Marc, Gérard, Marie-Christine, Renaud, Isabelle, Didier, Christophe.

Mes remerciements s'adressent également aux secrétaires plus particulièrement à Marie Pierre et Jocelyne pour leur bonne humeur et leur efficacité et jovialité, je vous adore !

Mes vifs remerciements à l'égard du personnel technique de l'UMR en particulier : Joël (non seulement pour son appui technique mais aussi pour son empathie et son encouragement), Adrien et Gilles.

Pour remercier ma famille j'ai envie de m'exprimer dans ma langue, le portugais : *muito obrigado Próspero Sinela pai e Gaudência Vange mãe, pós muitas das vezes vocês não dormiram angustiados pelas inúmeras viagens feitas pelo vosso cassula, mas graças à Deus a missão foi cumprida. Mery, minha esposa, obrigado pelo seu companheirismo, amor e apoio incondicional, és muito especial para mim. Aos meus manos Muculo, Harley, Mindo, e Yado, as minhas manas Larinha, Angélica, Calú e Nela só tenho a dizer o vosso amor faz de mim a pessoa que sou. Aos meus sobrinhos e netinhos, a quem muita das vezes não prestei atenção pelas viagens académicas, muito obrigado pelo apoio moral e compreensão. Aos meus cunhados Beny, Cláudio e André obrigado pelos conselhos incansáveis. Ao primo Memória pelo apoio incondicional.*

Ao corpo directivo do ISTAM, especialmente ao Dr. Guilherme e docentes em geral os meus sinceros agradecimentos.

Deux pages ne sont pas suffisantes pour exprimer toute ma gratitude, mille excuses aux personnes que j'ai oublié de mentionner. Enfin mes remerciements vont à tous ceux qui, de près et de loin, ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Les résultats de ce travail ont été ou vont être publiés sous forme d'articles

Sinela, A., Rawat, N., Mertz, C., Achir, N., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2017). Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products. *Food Chemistry*, 214, 234-241.

Vidot, K., Achir, N., Mertz, C., **Sinela, A.**, Rawat, N., Prades, A., Dangles, O., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2016). Effect of temperature on acidity and hydration equilibrium constants of delphinidin-3-O- and cyanidin-3-O-sambubioside calculated from uni- and multi-wavelength spectroscopic data. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2016, 64 (20), pp 4139–4145

Sinela, A., Mertz, C., Achir, N., Vidot, K., Rawat, N., Fulcrand, H., & Dornier, M. Degradation mechanisms of anthocyanin in a real beverage elucidated with kinetic studies on formulated model media. *Soumise au journal Food Chemistry*.

Ils ont également fait l'objet d'une communication orale et d'un poster :

Sinela, A., Rawat, N., Vidot, K., Mertz, C., Achir, N., Mouls, L., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2015). Anthocyanins degradation in *Hibiscus Sabdariffa* extract. The 8th International Workshop on Anthocyanins (IWA) du 16 au 18 Septembre, Montpellier, France.

Poster

Achir, N., Mertz, C., **Sinela, A.**, Vidot, K., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2016). Anthocyanin degradation of *Hibiscus sabdariffa* extracts during storage monitored by MCR-ALS on UV-VIS spectra. The Food Factor I Barcelona Conférence du 2 au 4 Novembre. Barcelone, Espagne.

Liste des abréviations

BI	Indice de brun
C ₁₈	Octadécylsilice
Cya-3Sb	Cyanidine 3-O-sambubioside
Del-3Sb	Delphinidine 3-O-sambubioside
DM	Matière sèche (dry matter)
FP	Fraction polyphénolique
CLHP-DAD	Chromatographie en phase liquide à haute performance- Détecteur à barrette de diodes
ICP	Spectrométrie à plasma à couplage inductif
LC	Chromatographie liquide
<i>m/z</i>	masse / charge atomique
MCR	Résolution Multivariée de Courbes
SM	Spectrométrie de masse
ESS	Extrait sec soluble
VR	Volume de résine solvatée
VP	Valeur pasteurisatrice

Notations mathématiques pour la MCR-ALS

C	Matrice de profil de concentration
D	Matrice de données brutes
E	Erreur
<i>k</i>	Rang de la matrice de données D
<i>m</i>	Nombre de lignes de D
<i>n</i>	Nombre de colonnes de D
S ^T	Matrice des spectres purs

Table des matières

Introduction générale	1
CHAPITRE I : Synthèse Bibliographique	4
1. <i>Hibiscus sabdariffa</i>	4
1.1 Présentation de la plante	4
1.2 Description botanique	5
1.3 Principales utilisations	5
1.4 Principales variétés	6
1.5 Importance socio-économique	8
1.6 Composition physico-chimique	8
1.6.1 Polyphénols	11
1.6.2 Anthocyanes	13
2. Stabilité des anthocyanes	16
2.1 Facteurs endogènes	17
2.1.1 pH	17
2.1.2 Ions Métalliques	22
2.1.3 Enzymes	23
2.1.4 Structure de l'anthocyane	25
2.1.5 Concentration en anthocyanes	26
2.1.6 Copigmentation	26
2.1.7 Sucres	28
2.2 Facteurs exogènes	29
2.2.1 Température	29
2.2.2 La teneur en oxygène	32
3. Cinétique de dégradation des anthocyanes	33
3.1 Ordre de réaction	34
3.2 Constantes cinétiques au cours des procédés thermiques et du stockage ..	34

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes	37
1. Matériels	37
1.1 Matériel végétal	37
1.2 Réactifs chimiques et composés de référence	37
2. Méthodes	37
2.1 Préparation des modèles d'étude.....	37
2.1.1 Préparation de l'extrait brut.....	37
2.1.2 Préparation de la fraction polyphénolique	38
2.1.3 Préparation des solutions modèles	38
2.2 Traitement thermique et stockage	40
2.3 Analyses physico-chimiques	40
2.3.1 Analyse des acides organiques	40
2.3.2 Analyse des sucres.....	41
2.3.3 Analyse des minéraux.....	41
2.3.3.1 Minéralisation par voie sèche et mise en solution	41
2.3.3.2 Dosage	41
2.3.4 Analyses des polyphénols.....	42
2.3.4.1 Identification par CLHP-SM	42
2.3.4.2 Quantification par CLHP-DAD	42
2.3.5 Suivi spectrophotométrique UV-visible dans les modèles d'études	43
2.3.6 Chromatographie d'exclusion.....	43
2.3.7 Mesure du pourcentage de couleur polymérique	43
2.4 Modélisation de la dégradation des anthocyanes.....	44
2.5 Étude de la fraction polymérique	45
2.5.1 Fractionnement de l'extrait.....	45
2.5.1.1 CLHP préparative	46
2.5.1.2 Analyse par résonance magnétique nucléaire.....	46

2.5.1.3	Hydrolyse acide de la fraction 1 (purifiée par CLHP préparative) ...	46
2.6	Détermination des constantes d'équilibre d'acidité et d'hydratation	47
2.6.1	Préparation des solutions	47
2.6.2	Méthode du saut de pH (pH-jump).....	47
2.6.3	Identification de K_a et K'_h avec la méthode de Brouillard	47
2.6.4	Identification de K_a et K'_h par la Résolution Multivariée de Courbes par Moindres Carrés Alternés (MCR-LAS)	49
2.6.5	Paramètres thermodynamiques	51
2.7	Analyses statistiques	51
CHAPITRE III	Résultats	52
1^{ère}	partie: Anthocyanins degradation during storage of <i>Hibiscus sabdariffa</i> extract and evolution of its degradation products	52
1.	Introduction	55
2.	Materials and methods.....	56
2.1	Plant material.....	56
2.2	Reagents	56
2.3	Extract preparation, thermal treatment and storage	56
2.4	Identification and quantification of polyphenol compounds.....	57
2.5	Kinetic modeling of anthocyanin degradation	57
2.6	Spectrophotometric measurements	58
2.7	Analysis of minerals.....	59
3.	Results and discussion	59
3.1	Identification and composition of polyphenols	59
3.2	Evolution pattern of anthocyanins during storage at different temperatures	63
3.3	Identification of dégradation compounds	68
3.4	Kinetics of the evolution of the UV-VIS spectrum during storage	70
3.4.1	Brown index	70
3.4.2	Polymeric color index.....	72

Conclusion	73
2^{ème} partie: Effect of temperature on acidity and hydration equilibrium constants of delphinidin-3-O- and cyanidin-3-O-sambubioside calculated from uni- and multi-wavelength spectroscopic data	77
1. Introduction	80
2. Material and methods.....	83
2.1 Solution preparation	83
2.2 pH-jump experiments	84
2.3 Equilibrium constant determination.....	84
3. Results	87
3.1 pH-Jump method.....	87
3.2 MCR method	91
3.3 Equilibrium constant in <i>Hibiscus sabdariffa</i> extract.....	94
4. Discussion	95
3^{ème} partie : Exploration of reaction mechanisms of anthocyanin degradation in a roselle extract through kinetic studies on formulated model media	100
1. Introduction	103
2. Materials and methods.....	104
2.1 Plant material.....	104
2.2 Chemicals.....	104
2.3 Preparation of the extract and polyphenolic fraction.....	104
2.4 Preparation of model media	105
2.5 Analyses.....	107
2.6 Kinetic modeling of anthocyanin degradation	107
3. Results and discussions	108
3.1 Compositions.....	108
3.2 Comparison of stability of anthocyanins in extract and polyphenolic fraction	

3.3	Effect of dissolved oxygen	110
3.4	Effect of constituents of extract studied in model media	111
3.4.1	Effect of metals	112
3.4.2	Effect of iron concentration	114
3.4.3	Effect of polyphenols.....	117
3.5	Mechanism of degradation of anthocyanins	119
CHAPITRE IV : Synthèse des résultats et discussion		126
1.	Caractérisation physico-chimique de l'extrait d'hibiscus	128
2.	Etude cinétique de la dégradation des anthocyanes dans l'extrait	129
3.	Évolution des constantes d'équilibre en fonction de la température	130
4.	Elucidation de l'effet des constituants de l'extrait sur la dégradation des anthocyanes en milieux modèles.....	131
5.	Voies prépondérantes de la dégradation des anthocyanes dans l'extrait d'hibiscus.....	135
6.	Étude de la voie de polymérisation.....	137
6.1	Paramètres colorimétriques de l'extrait	137
6.1.1	Densité de la couleur	137
6.1.2	Pourcentage de couleur polymérique	138
6.2	Paramètre colorimétrique dans les fractions monomériques et polymériques	139
6.3	Évolution des spectres UV-vis des fractions F1 et F3 et déconvolution par la MCR	141
6.4	Étude de la fraction polymérique	145
Conclusions générales et perspectives		148
Références Bibliographiques		150
ANNEXES		161

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : fleurs (a), calices (b) et fruits (c) d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	5
Figure 2 : calices séchés de quatre variétés d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> (Cisse <i>et al.</i> , 2009b)	7
Figure 3 : squelette de base des flavonoïdes	11
Figure 4 : structure des différents polyphénols présents dans des extraits d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	12
Figure 5 : structures et caractéristiques spectrales de quelques anthocyanidines (Sadilova <i>et al.</i> , 2006)	14
Figure 6 : structure des anthocyanes identifiées dans diverses variétés d' <i>H.sabdariffa</i> (Cisse <i>et al.</i> , 2009b)	16
Figure 7 : principales formes des anthocyanes en équilibre existant en milieu aqueux (Brouillard, 1982)	17
Figure 8 : distribution des différentes formes en équilibre de la malvidine-3-O-glucoside selon le pH. X quantité relative de la forme en équilibre ; AH ⁺ cation flavylum ; A base quinonoïdale ; B carbinol et C chalcone (Brouillard, 1982).....	19
Figure 9 : spectre d'absorption visible de la malvidine 3-O-glucoside à pH 2, 6 et 10 (25 °C) (Brouillard, 1982).....	20
Figure 10 : complexation métallique des anthocyanes (Esparza <i>et al.</i> , 2004)	22
Figure 11 : O-diphénols (a) sensés être chelatés par le Fe ³⁺ pour former des quinones par phénomène d'oxydation (b) (Perron <i>et al.</i> , 2010).....	23
Figure 12 : effet hyperchrome et bathochrome de la copigmentation. A Cyanidine 3-glucoside et B Cyanidine 3-glucoside + acide rosmarinique (Rein, 2005).....	27
Figure 13 : exemple de copigmentation intermoléculaire des anthocyanes (Castañeda-Ovando <i>et al.</i> , 2009).....	28
Figure 14 : quelques mécanismes de dégradation thermique des anthocyanes en milieu modèle cités dans la littérature	30
Figure 15 : schéma de formation des polymères bruns (Perron <i>et al.</i> , 2010).....	33
Figure 16 : macération (a) et filtration (b) de l'extrait d'hibiscus	38
Figure 17 : Degradation kinetics of delphinidin 3-O-sambubioside (a) and cyanidin 3-O-sambubioside (b) in <i>Hibiscus sabdariffa</i> extracts during storage at different	

temperatures (◆ 4, ▲ 20, ●30 and ■ 37°C). Dots are experimental data and dashed lines modeled values.	64
Figure 18: Mechanism of thermal degradation by scission adapted to <i>Hibiscus sabdariffa</i> anthocyanins adapted from Sadilova <i>et al.</i> , 2006; Seeram <i>et al.</i> , 2001 and Sun <i>et al.</i> , 2011.	69
Figure 19: Evolution of scission products of delphinidin 3-O-sambubioside (■ gallic acid) and cyanidin 3-O-sambubioside (◆protocatechuic acid) during storage at 37°C of <i>Hibiscus sabdariffa</i> extracts.	70
Figure 20: Brown index (a) during storage at different temperatures (◆ 4, + 20, ▲30 and x 37°C) and polymeric color index evolution (b) during storage at 37°C of <i>Hibiscus sabdariffa</i> extract.	71
Figure 21. Structural transformations of anthocyanins in mildly acidic aqueous solution. R = H, Cya-3Sb; R = OH, Del-3Sb (Sb = β -D-xylosyl- (1→2)- β -D-glucosyl).	82
Figure 22. Treatment of data obtained by the pH-jump method for one experiment at 25°C with cyanidin-3-O-sambubioside. A: estimation of the apparent first-order rate constant (khobs) according Eq. 2, B: determination of the Ka + K'h sum according Eq.3, C: determination of Ka according Eq. 4.	87
Figure 23. Van't Hoff plots (Eq. 8) for acidity and hydration equilibria. Data obtained by the pH-jump method (A) and MCR method (B) with their standard deviation.	90
Figure 24. Complex UV-VIS spectra of cyanidin-3-O-sambubioside at 25°C.	91
Figure 25. Normalized spectra of the three pure compounds (part A) and time dependence of their concentration (part B) deduced from MCR-ALS with experimental data of Figure 24.	92
Figure 26. Distribution diagram of the different Del-3Sb forms in equilibrium as a function of pH, deduced from MCR analysis at 25°C.	93
Figure 27: Effect of metals (a) and Fe III concentration (b) on the degradation of and cyanidin 3-O-sambubioside and delphinidin 3-O-sambubioside in model media.	113
Figure 28: Molar fraction of scission products as a function of conversion rate (τ) in model media. Protocatechuic acid vs. cyanidin 3-O-sambubioside C (a) and gallic acid vs. delphinidin 3-O-sambubioside D (b). ◆ (C or D+CA+Fe 1mg.kg ⁻¹), ж (C+CA+Fe 7mg.kg ⁻¹), Δ (C or D +CA+Fe 13mg.kg ⁻¹), □ (C or D +CA+Fe 1mg.kg ⁻¹ + Cu 0.3 mg.kg ⁻¹ + Mn 20 mg.kg ⁻¹) and O (C or D in extract).	116

Figure 29: Effect of polyphenolics compounds on the degradation of cyanidin 3-O-sambubioside and delphinidin 3-O-sambubioside.	117
Figure 30: Mechanism of degradation of cyanidin 3-O-sambubioside and delphinidin 3-O-sambubioside by scission and oxidation.....	119
Figure 31 : schéma de synthèse des voies de scission a) et de polymérisation b) des anthocyanes d'hibiscus.....	136
Figure 32 : évolution de la densité de couleur dans l'extrait durant le stockage à 37 °C.....	138
Figure 33 : évolution du pourcentage de couleur polymérique dans l'extrait durant le stockage à 37 °C	139
Figure 34 : évolution de la densité de couleur dans les fractions F1 et F3 de l'extrait durant le stockage à 37 °C.....	140
Figure 35 : évolution de la couleur polymérique dans la fraction F1 de l'extrait au cours du stockage à 37 °C.....	140
Figure 36 : évolution des spectres des extraits fractionnés au cours du stockage (en jours) : A) fraction F1 des molécules à haut poids moléculaire et B) fraction F3 des molécules à faible poids moléculaire.....	141
Figure 37 : spectres purs obtenus par MCR sur a) fraction F1 des molécules à haut poids moléculaire et b) fraction F2 des molécules à faible poids moléculaire.....	143
Figure 38 : concentrations relatives des différentes espèces obtenues par MCR sur les spectres de l'extrait au cours du stockage	144
Figure 39 : chromatogramme de la fraction F1 purifiée à la CLHP préparative	145
Figure 40 : chromatogrammes CLHP à 280 nm de la fraction F1 purifiée avant hydrolyse (trait noir) et après hydrolyse (trait bleu).....	146

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : différentes appellations de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	4
Tableau 2 : principales caractéristiques de quatre variétés d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> de type rouge (Cisse <i>et al.</i> , 2009b).....	8
Tableau 3 : composition physico-chimique des calices frais d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	9
Tableau 4 : acides aminés présents dans les calices secs d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	10
Tableau 5 : acides organiques présents dans les calices secs d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	10
Tableau 6 : teneurs en polyphénols dans des extraits d' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	13
Tableau 7 : exemples de sucres et acides communément trouvés dans la nature, intervenant dans la glycosylation et acylation des anthocyanes.....	15
Tableau 8 : expressions des constantes d'équilibre des anthocyanes dans des solutions aqueuses (Lopes <i>et al.</i> , 2007).....	18
Tableau 9 : quelques valeurs de constantes d'acidité et d'hydratation d'anthocyanes sous différentes conditions.....	21
Tableau 10 : produits de dégradation du noyau B de différentes anthocyanidines....	31
Tableau 11 : quelques paramètres cinétiques de dégradation des anthocyanes.....	34
Les solutions ont été préparées par solubilisation des standards commerciaux dans une solution d'acide malique, acide majoritaire de l'hibiscus, à une concentration de 0,1 M (pH 2,2). La composition de chaque solution modèle est présentée dans les tableaux 12 et 13. Ces solutions sont ensuite stockées à 37 °C.....	38
Tableau 12 : composition des solutions modèles à base d'anthocyanes.....	39
Tableau 13 : composition des solutions modèles sans anthocyane.....	40
Tableau 14 : gradient d'élution utilisé pour l'analyse CLHP-SM des polyphénols.....	42
Tableau 24 : synthèse des principaux composés impliqués dans la dégradation des anthocyanes.....	132
Table 15: Polyphenol identification in <i>Hibiscus sabdariffa</i> extract and HPLC chromatogram (5-60min) at 360 nm of <i>Hibiscus sabdariffa</i> extract:.....	61
Table 16: Rate constants (k) and Arrhenius parameters of anthocyanin degradation in <i>Hibiscus sabdariffa</i> extracts.....	65
Table 17. Hydration equilibrium constants of some anthocyanins ⁸⁻¹⁰	82

Table 18. Acidity and hydration equilibrium constants of cyanidin-3-O-sambubioside (Cya-3Sb) and delphinidin-3-O-sambubioside (Del-3Sb) at different temperatures (pH-jump method).....	89
Table 19. Hydration equilibrium constants of cyanidin-3-O-sambubioside and delphinidin-3-O-sambubioside at different temperatures from the MCR method.....	94
Table 20: Formulation of model media (concentrations in mg.L ⁻¹).....	106
Table 21: Chemical composition of the extract and polyphenolic fraction from <i>Hibiscus sabdariffa</i>	109
Table 22: Degradation rate constant $k \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ of anthocyanins in different model media.....	111
Table 23: Rate constants $k \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ of overall degradation of cyaniding 3-O-sambubioside, scission k_1 and other pathways k_2 in model media at different iron concentrations.	115

Introduction Générale

Introduction générale

Hibiscus sabdariffa L. encore appelé roselle ou bissap est une plante herbacée (1 à 2 m de hauteur) de la famille des Malvacées dont les calices contiennent de fortes teneurs en composés phénoliques. Originaires d'Inde, elle est largement cultivée dans toute l'Afrique tropicale et présente localement un réel potentiel économique de développement.

L'intérêt économique de cet hibiscus est principalement lié à l'utilisation de ses calices séchés pour la production de boissons, après macération ou décoction dans l'eau. Ces boissons constituent des extraits riches en composés phénoliques dont les principaux sont des anthocyanes et des acides phénols (acides caféoylquiniques). La couleur rouge des calices est due à leur richesse en anthocyanes dont les majoritaires sont la delphinidine 3-O-sambubioside et la cyanidine 3-O sambubioside. Ces composés peuvent être utilisés comme colorants naturels que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans d'autres secteurs tels que l'industrie pharmaco-cosmétique.

La couleur est un facteur important pour accroître l'acceptabilité des produits alimentaires. De nombreux aliments contenant des anthocyanes sont traités thermiquement avant consommation. Ce processus peut générer des pertes de teneur en anthocyanes dans le produit final et provoquer des modifications de la couleur rouge initiale. La préparation d'une boisson à base d'hibiscus comprend une étape d'extraction suivie par une pasteurisation et un stockage. Même après stabilisation des extraits, les anthocyanes se dégradent lors du stockage. Cette dégradation s'accompagne d'un brunissement des extraits. L'effet sur la stabilité des anthocyanes du traitement thermique préalable au stockage est plus au moins marqué selon son intensité. Quoiqu'il en soit, l'instabilité de la couleur des extraits est préjudiciable au développement des produits à base d'hibiscus. La dégradation des anthocyanes dans ces extraits met en jeu des mécanismes complexes et encore mal élucidés.

Dans ce contexte, l'objectif de la thèse est d'approfondir l'étude mécanistique et cinétique de la dégradation des anthocyanes dans un extrait d'*Hibiscus sabdariffa*. Pour ce faire, il est nécessaire d'identifier les composés impliqués dans la

dégradation des anthocyanes ainsi que les composés résultant de cette dégradation. L'étude cinétique des réactions observables dans l'extrait a pour but de mettre en évidence les principaux mécanismes impliqués dans la dégradation et d'accéder aux constantes cinétiques qui permettront de prédire les pertes en anthocyanes au cours du stockage de l'extrait. La comparaison de ces données cinétiques en fonction de différentes conditions opératoires et différentes formulations de milieux réactionnels modèles permettra de préciser et caractériser les voies réactionnelles prépondérantes et de préconiser des conditions de stockage des extraits pour minimiser la dégradation des anthocyanes et améliorer la stabilité des boissons à base d'hibiscus.

Le premier chapitre de ce document propose tout d'abord une synthèse bibliographique sur la matière première, à savoir les calices d'*Hibiscus sabdariffa*. Il recense ensuite les principaux facteurs qui interviennent dans la dégradation des anthocyanes et leurs principales voies de dégradation ainsi que les paramètres thermodynamiques et cinétiques identifiés pour différentes anthocyanes dans différentes matrices alimentaires. Le second chapitre sera classiquement consacré aux matériels et aux méthodes. Y seront décrits la variété d'*Hibiscus sabdariffa* utilisée, le mode de préparation de l'extrait et des solutions modèles, les méthodes d'analyses mobilisées et les dispositifs expérimentaux mis en œuvre. Le chapitre suivant regroupe l'ensemble des résultats obtenus. La rédaction de ce chapitre s'appuie, lorsque cela est possible, sur les articles scientifiques issus de ce travail (déjà publiés ou en cours d'évaluation). La première partie de ce chapitre présente la caractérisation physicochimique de la matière première, l'étude de la dégradation des anthocyanes majoritaires dans l'extrait à différentes températures de stockage et l'évolution de leurs produits de dégradation respectifs (**publication 1**). La détermination des constantes d'équilibre d'hydratation et d'acidité, paramètres thermodynamiques importants pour étudier la stabilité des anthocyanes, est étudiée dans la seconde partie pour chaque anthocyane majoritaire en fonction de la température (**publication 2**). Les mécanismes de dégradation des anthocyanes majoritaires de l'hibiscus sont ensuite plus finement explorés grâce à des études cinétiques dans des milieux modèles (**publication 3**). Ces milieux visent à découpler et quantifier l'effet de différents facteurs sur la dégradation des anthocyanes et la formation de produits de dégradation. L'effet de l'oxygène dissous, des polyphénols

(acides chlorogénique et gallique, phloroglucinaldéhyde et anthocyanes) et des métaux (Fe, Cu et Mn) y est abordé. Enfin, une dernière partie s'intéressera plus particulièrement à la caractérisation de composés de dégradation à haut poids moléculaire et de leur dynamique de formation par différentes techniques analytiques. Ce manuscrit se termine par une synthèse des résultats obtenus au cours de ce travail, une discussion et une conclusion avec les perspectives envisagées.

CHAPITRE I :
Synthèse Bibliographique

1. *Hibiscus sabdariffa*

1.1 Présentation de la plante

Hibiscus sabdariffa L., de la famille des malvacées, est connu sous différentes appellations (Tableau 1) : *oseille de Guinée* ou *bissap* au Sénégal, *karkadé* en Afrique du Nord, *ngai-ngai* en Afrique centrale, *groseille de Noël* aux Antilles, *flores de Jamaica* en Amérique centrale et *roselle*, *sorrel* ou *sour tea* dans des pays anglo-saxons (Cisse *et al.*, 2009b).

Tableau 1 : différentes appellations de l'*Hibiscus sabdariffa* L.

Régions	Nom commun	Source
Anglophone	Roselle, sorrel, sour-sour, Queensland jelly plant, jelly okra, lemon bush, Florida cranberry	(Morton, 1987)
Francophone	Oseille rouge, oseille de Guinée	(Morton, 1987)
Hispanophone	Quimbombó chino, sereni, rosa de Jamaica, flor de Jamaica, Jamaica, agria, agrio de Guinea, quetmia ácida	(Morton, 1987)
Lusophone	Vinagreira azeda de Guiné, cururú azédo, et quiabeiro azédo	(Ismail <i>et al.</i> , 2008)
Néerlandophone	Zuring	(Ismail <i>et al.</i> , 2008)
Afrique	Bissap, karkadé, sorrel	(Cisse <i>et al.</i> , 2009b)
Australie	Chin baung	(Ismail <i>et al.</i> , 2008)

Cette plante est largement distribuée dans les zones tropicales et subtropicales des deux hémisphères, des Indes occidentales à l'Amérique centrale et en Asie où l'espèce s'est adaptée. *L'Hibiscus sabdariffa* est présent en Thaïlande, au Vietnam, en Malaisie et en Chine. En Afrique on la trouve plus particulièrement en Egypte, au

Sénégal, en Tanzanie, au Mali, au Soudan et au Tchad. Elle est également cultivée en Amérique du Sud particulièrement au Mexique (Clydesdale *et al.*, 1979).

1.2 Description botanique

Selon Clydesdale *et al.* (1979), l'hibiscus est une plante pérenne herbacée pouvant atteindre 1 à 2 m de hauteur. Les feuilles sont ovales, alternées, trilobées ou simples sur des tiges fleuries. Elles sont réparties tout au long de la tige et présentent un diamètre qui varie entre 7 et 10 cm. Leur couleur est rose à la périphérie, devenant jaune à l'intérieur pour finir avec un cœur pourpre bordeaux (Figure 1a). Le calice, presque glabre, est formé de 5 sépales auxquels se soude un calicule extérieur multifide (Figure 1b).

Le fruit est une capsule ovoïde à 5 loges composées chacune de 3 lames minces, lisses à l'intérieur et hérissées à l'extérieur de poils fins et piquants. La capsule contient les graines (Figure 1c) (Paul, 1995)

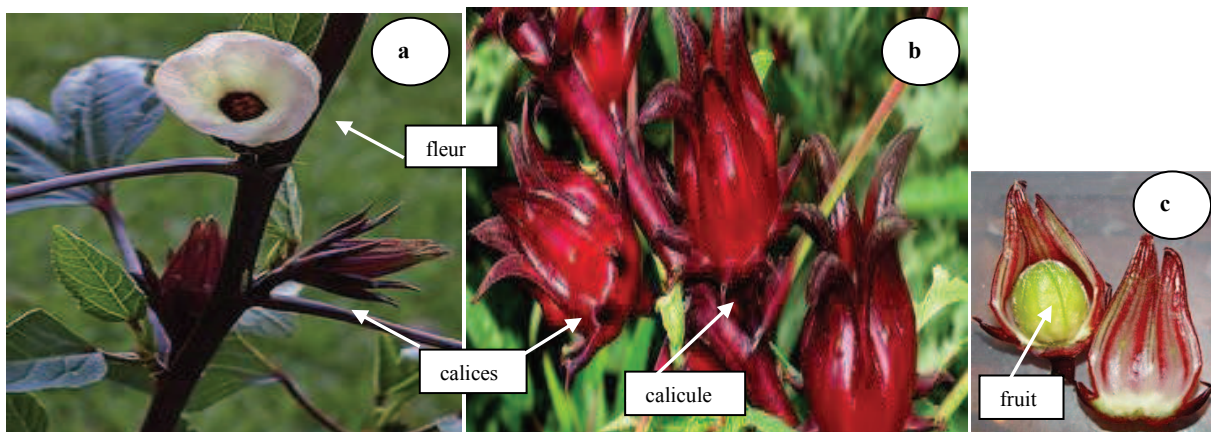


Figure 1 : fleurs (a), calices (b) et fruits (c) d'*Hibiscus sabdariffa* L.

1.3 Principales utilisations

La culture du bissap se présente actuellement comme une source de revenus non négligeable pour les agriculteurs de l'Afrique de l'ouest. De nombreux producteurs cultivent le bissap pour leur propre consommation et les surplus sont commercialisés aussi bien sur le marché local que pour l'exportation (Coly *et al.*, 2005).

L'espèce *H. sabdariffa* est utilisée dans l'alimentation humaine et dans l'industrie agroalimentaire. La plante est exploitée pour ses calices, feuilles et graines (Cisse *et al.*, 2009b).

Les calices, du fait de leur concentration élevée en acides, pectines et surtout en anthocyanes, constituent la partie de la plante la plus valorisée. Ils sont récoltés à la main avec un sécateur ou un couteau, 2 à 3 semaines après la floraison, habituellement 4 à 6 mois après le semis, avant que le fruit ne se dessèche et ne s'ouvre. Après décorticage, les calices sont séchés par exposition directe au soleil sur des nattes, des tôles ou des toiles en plastique étalées directement sur le sol. Leur humidité diminue de 86% à 14-16%. Ils sont ensuite conditionnés en sac de jute de 50 kg pour l'exportation (Cisse *et al.*, 2009b).

Les calices sont utilisés pour la production de boissons désaltérantes et tonifiantes sans alcool (Cisse *et al.*, 2009b). Ces boissons sont toutes élaborées à partir d'un extrait aqueux obtenu après trempage des calices dans de l'eau chaude ou à température ambiante avec un ratio massique (calice/eau) entre 1/5 et 1/30. Après filtration, du sucre ainsi que d'autres ingrédients (jus de fruits, aromatisants, etc.) peuvent être ajoutés selon le pays pour la confection de la boisson finale. Cette boisson présente une coloration rouge foncé (Cisse *et al.*, 2009b).

Des confitures, des sirops, des infusions, des gelées et des desserts élaborés à partir des calices sont également proposés. Les confitures d'*H. sabdariffa* sont appréciées aux États-Unis, en Australie, au Sénégal, dans les Caraïbes et en Asie. Les calices sont aussi utilisés en Thaïlande pour fabriquer une boisson fermentée alcoolisée qui s'apparente à du vin (Mounigan et Badrie, 2007).

Enfin, des extraits de calices liquides concentrés ou sous forme de poudre séchée sont utilisés comme colorant naturel par les industries alimentaires (pâtisserie, jus de fruits, boissons, etc) et pharmaceutiques. Cependant, actuellement, leur emploi est limité et pose problème du fait de l'instabilité des pigments lors de la conservation du produit (Francis, 1990 ; Pouget *et al.*, 1990).

1.4 Principales variétés

Plus de 500 espèces d'hibiscus sont connues dans le monde (Kerharo and Adam, 1974). Cisse *et al.* (2009b) ont étudié les caractéristiques de 4 variétés d'*Hibiscus sabdariffa* cultivées au Sénégal : Koor, Thaïlandaise (Thai), CLT 92 et Vimto (Figure 2 et Tableau 2).



Figure 2 : calices séchés de quatre variétés d'*Hibiscus sabdariffa* (Cisse *et al.*, 2009b)

La variété Vimto donne de grandes fleurs avec des sépales ouverts vers l'extérieur. Elle est réputée pour présenter une teneur en anthocyanes (dans les calices secs) supérieure à celle des 3 autres. Les calices sont de couleur rouge sombre et peu acides. Le rendement en calices séchés peut atteindre dans les conditions optimales des valeurs élevées ($500 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). Cette variété, originaire du Soudan, bénéficie d'une excellente réputation sur les marchés internationaux (Coly *et al.*, 2005).

La variété Koor se distingue par un calice conique de petite taille. Elle est moins riche en extrait sec et en anthocyanes mais présente des teneurs plus élevées en acides organiques. Ses calices sont plus acides que ceux de la variété Vimto (Cisse *et al.*, 2009b). Son rendement en calices séchés est plus faible. Cette variété est fréquemment utilisée en mélange avec la variété Vimto, pour rehausser le goût acidulé lors de la transformation des calices en boisson et confiture (Cisse *et al.*, 2009b).

La variété Thaïlandaise, appelée Thaï, se distingue des précédentes par la grande taille de la plante. Cette variété a été sélectionnée en Thaïlande pour sa richesse en fibres. Ses calices rouges sont mouchetés. Son cycle végétatif est assez long et sa production de calices est inférieure à celle de Vimto (Cisse *et al.*, 2009b).

Tableau 2 : principales caractéristiques de quatre variétés d'*Hibiscus sabdariffa* de type rouge (Cisse *et al.*, 2009b)

Variétés	Morphologie	Calices (longueur/diamètre) (cm)	Cycle végétatif (j)	Couleur calices	Teneur en anthocyanes (g.kg ⁻¹)	Rendement calices secs (kg.ha ⁻¹)
Vimto	Sépales ouverts vers l'extérieur, droits, légèrement recourbés au sommet	8,5/ 4,5	140	Rouge sombre	10-15	500
Koor	Calice de forme conique	4,5/ 3,5	120	Rouge clair	3-7	250-300
Thai	Arbre de grande taille (2 m), riche en fibres	4,5/ 3,5	165	Rouge clair	7-7,8	250-300
CLT 92	Arbre de taille moyenne	4,5/ 3,5	130	Rouge foncé ou bleu violacé	~ 9,7	250-300

1.5 Importance socio-économique

Les besoins en calices d'*H. sabdariffa* du marché national au Sénégal pour la transformation domestique et artisanale s'élèvent à 700 t. Le prix des calices secs est très variable selon le lieu de commercialisation et la période de l'année (0,61 à 1,52 €.kg⁻¹ de calices secs). Les prix sur le marché mondial connaissent de grandes fluctuations. La moyenne du marché se situe entre 897 et 2 243 €.t⁻¹ (Cisse *et al.*, 2009a).

Les exportations de calices d'*H. sabdariffa* se font essentiellement vers les États-Unis et l'Europe. La France et l'Allemagne constituent 80% du marché européen avec 3 000 t de calices. Les calices exportés sont destinés à l'industrie alimentaire et cosmétique (Cisse *et al.*, 2009a).

1.6 Composition physico-chimique

Les calices, principale partie exploitée de la plante, ont une composition très variable (Tableau 3). Cette variabilité peut être due à plusieurs facteurs tels que les conditions de culture, la variété, la nature des sols, la pluviométrie et le pays d'origine des calices (Ifie *et al.*, 2016 ; Morton, 1987).

Tableau 3 : composition physico-chimique des calices frais d'*Hibiscus sabdariffa*

Composition générale	(g.100g⁻¹)
Protéines	1,5 ^Δ -1,7 ^Δ
Lipides	0,1 ^Δ -3,9 ^Δ
Sucres	
Glucose	1,3 [*] -2,4 [†]
Fructose	1,1 [*] -1,9 [†]
Saccharose	0,5 [†] -0,9 [*]
Fibres	0,5 ^Δ -12 ^Δ
Cendres	0,9 ^Δ -1,3 [§]
Matière sèche	7,3 ^Δ -12 ^Δ
pH	2,1 ^Δ -2,4 ^Δ
Extrait sec soluble	3,3 ^Δ -5,0 [*]
Acidité titrable (acide malique)	2,4 [*] -11,1 ⁺
Micro-constituants	(mg.100g⁻¹)
Polyphénols totaux	3,7 ^Δ -470 ⁺
Minéraux	
Phosphore	40 ^Δ -312 ^Δ
Calcium	1,3 ^Δ -213 ^Δ
Fer	2,9 ^Δ -38 ^Δ
Manganèse	2,4 ⁺ -11 ^Δ
Cuivre	0,8 ^Δ -4,3 ⁺
Zinc	1,2 ^Δ -6,51 ⁺

^{*}Wong, *et al.*, (2002); [§] D'Heureux–Calix et Badrie (2004); ⁺ Cisse *et al.*, 2009;

^ΔArab-Arab *et al.*,(2011); [†] Jung, *et al.*, (2013)

Les calices d'hibiscus contiennent également des acides aminés essentiels (Tableau 4) ainsi que des acides organiques, l'acide malique étant majoritaire (Tableau 5).

Tableau 4 : acides aminés présents dans les calices secs d'*Hibiscus sabariffa*

Acides aminés	mg·100 g ⁻¹ de matière sèche
Arginine [□]	36-105
Histidine [□]	15-29
Isoleucine *	30-32
Leucine *	50-73
Cystine *	13-26
Lysine *	39-54
Méthionine *	10-11
Phénylalanine *	32-51
Thréonine [□]	30-48
Tyrosine *	22-35
Valine *	33-38
Acide Aspartique [□]	109-163
Acide Glutamique [□]	72-213
Alanine [□]	37-47
Glycine [□]	26-38
Proline [□]	42-56
Sérine [□]	35-44

*Acides aminés essentiels Cisse *et al.*, (2009b) & [□]Ismail *et al.*, (2008)

Tableau 5 : acides organiques présents dans les calices secs d'*Hibiscus sabariffa*

Acides organiques	(mg.g ⁻¹)
Malique	25 ^Δ -275 [*]
Oxalique	0,6.10 ^{-4*} -8 ^Δ
Ascorbique	0,5 [§] -5 ^Δ
Tartrique	2,8.10 ^{-4*} -4 ^Δ
Citrique	1,5.10 ^{-3*} -0,3 ^Δ

^ΔCisse (2010) * Jung, *et al.*, (2013) & [§]Nnam et Onyeke, (2003)

1.6.1 Polyphénols

Les composés polyphénoliques comprennent une grande variété de molécules structurées en cycles aromatiques comprenant des groupes hydroxyles. Ils sont divisés en plusieurs catégories en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et des structures moléculaires liées à ces cycles (Ignat *et al.*, 2011).

Les flavonoïdes représentent une sous-classe de polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) (Figure 3).

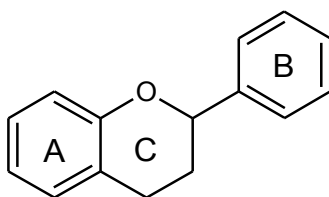
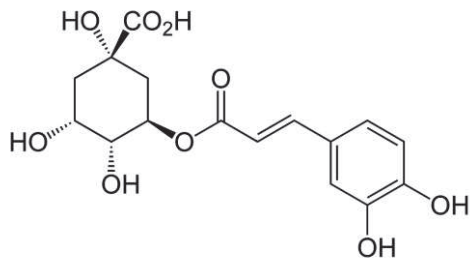
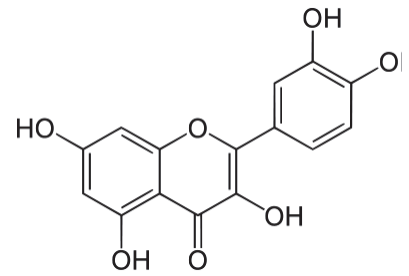


Figure 3 : squelette de base des flavonoïdes

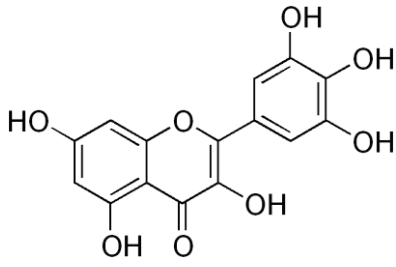
Les structures des principaux polyphénols présents dans l'extrait d'hibiscus dans la littérature sont présentées dans la Figure 4 (Mourtzinou *et al.*, 2008 ; Cisse *et al.*, 2009b ; Fernández-Arroyo *et al.* 2011 ; Reyes-Luengas *et al.*, 2015). Les anthocyanes sont connues pour appartenir à ce groupe de composés polyphénoliques (Ignat *et al.*, 2011) et leur structure sera détaillée dans le paragraphe 1.6.2.



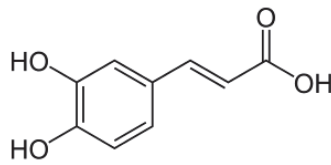
Acide chlorogénique



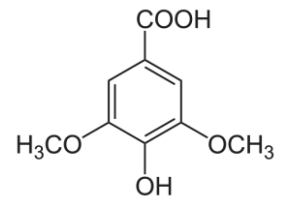
Quercétine



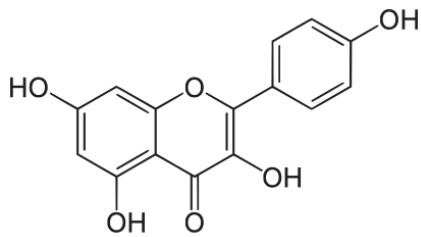
Myricétine



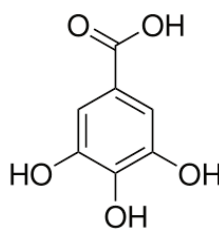
Acide caféique



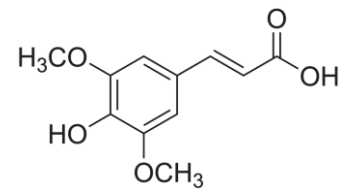
Acide syringique



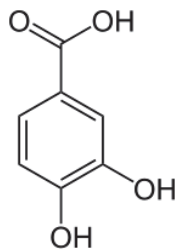
Kampférol



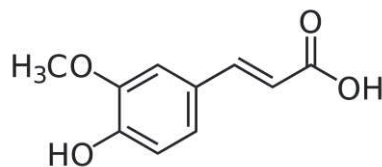
Acide gallique



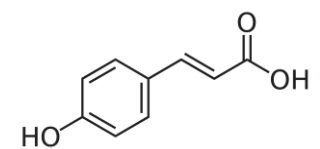
Acide sinapique



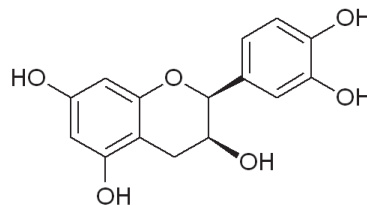
Acide protocatéchique



Acide férulique



Acide p-coumarique



-Epicatéchine

Figure 4 : structure des différents polyphénols présents dans des extraits d'*Hibiscus sabdariffa*

Les teneurs en polyphénols d'extraits d'*H. sabdariffa* mentionnées dans la littérature sont assez variables (Tableau 6).

Tableau 6 : teneurs en polyphénols dans des extraits d'*Hibiscus sabdariffa*

Composé	Extrait <i>H. sabdariffa</i> L (mg.g ⁻¹)
Acide chlorogénique	1,04 [*] -46 [□]
Anthocyanines	1,5 [△] -1,93 [*]
Quercétine	0,12 [*] -8,71 [□]
Myricétine	0,01 [*] -5,21 [□]
Acide caféique	0,17 [*] -1,79 [□]
Acide syringique	0,31 [∨] -1,61 [□]
Kampférol	0,03 [*] -1,44 [□]
Acide gallique	0,23 [∨] -0,71 [□]
Acide sinapique	0,21 [∨] -0,49 [□]
Acide protocatéchique	0,14 [□] -0,25 [∨]
Acide férulique	0,01 [∨] -0,19 [□]
Acide p-coumarique	0,04 [∨] -0,16 [□]
Epicatechine	0,13 [□]

[□] Mourtzinou *et al.*, (2008); [△] Cisse *et al.*, (2009b); ^{*}Fernández-Arroyo, *et al.*,(2011) & [∨]Reyes-Luengas, *et al.*, (2015).

La teneur en anthocyanes varie selon la variété de la plante et la méthode d'extraction (Tsai et Huang, 2004). La variété Vimto peut contenir jusqu'à 14,8 g.kg⁻¹ d'anthocyanes (calices sec) alors que la variété Thai n'en contient que 7,7 g.kg⁻¹. Les variétés Koor et CLT 92 ont des concentrations en anthocyanes respectives de 5 et 9,6 g.kg⁻¹ (Cisse *et al.*, 2009b ; Coly *et al.*, 2005) Le pH des extraits d'*Hibiscus sabdariffa* varie entre 2,1 et 2,4 (Cisse *et al.*, 2009b).

1.6.2 Anthocyanes

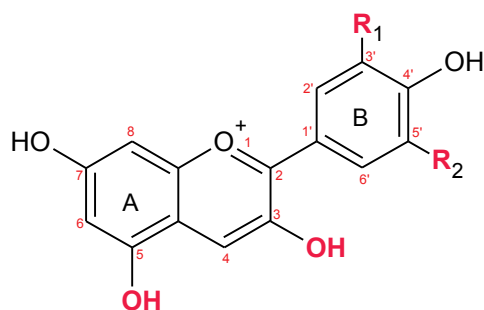
Les anthocyanes sont des composés polyphénoliques responsables des couleurs rouge, violet et bleu foncé de la plupart des fleurs, fruits, feuilles et tiges (Kong *et al.*, 2003).

Leur fort pouvoir colorant et leur solubilité en milieu aqueux font des anthocyanes des colorants naturels des aliments susceptibles de remplacer les colorants synthétiques utilisés dans l'industrie agroalimentaire (Clifford, 2000 ; Stintzing et Carle, 2004).

L'activité anti-oxydante des anthocyanes laisse supposer que leur apport dans l'alimentation pourrait jouer un rôle bénéfique dans la santé humaine, notamment dans la lutte contre les risques cardiovasculaires, le vieillissement cellulaire ainsi que le renforcement des vaisseaux sanguins situés dans l'épiderme (Clifford, 2000).

Les anthocyanes sont des dérivés hydroxylés et méthoxylés de sels de phényl-2-benzopyrylium ou flavylum (Wrolstad, 2000).

Leur structure de base, également appelée aglycone ou anthocyanidine (groupement chromophore du pigment), peut subir des variations au niveau des groupements de substitution du noyau B, résultant en 6 groupes majeurs d'aglycone (Figure 5) (Sadilova *et al.*, 2006).



Aglycone	Schéma de substitution		λ_{\max} (nm) spectre visible
	R ₁	R ₂	
Pélagonidine	H	H	494 (orange)
Cyanidine	OH	H	506 (orange-rouge)
Delphinidine	OH	OH	508 (bleu-rouge)
Péonidine	OCH ₃	H	506 (orange-rouge)
Pétunidine	OH	OCH ₃	508 (bleu-rouge)
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃	510 (bleu-rouge)

Figure 5 : structures et caractéristiques spectrales de quelques anthocyanidines (Sadilova *et al.*, 2006)

Dans la nature, les anthocyanes sont toujours présents sous forme glycosylée, jamais comme aglycone non substituée. Parmi plus de 500 anthocyanes identifiées (Brouillard, 1993), la plupart des variations structurelles rencontrées concernent les substitutions sur les positions 3 ou 5 (Figure 5) par des mono-, di- ou tri-saccharides (Tableau 7).

Les groupes hydroxyles et méthoxyles affectent non seulement la stabilité des anthocyanes mais également leur spectre d'absorption et par conséquent leur

couleur. La couleur des anthocyanes évolue du rose au bleu quand le nombre d'hydroxyles augmente. Quand ces groupes hydroxyles sont remplacés par les groupes méthoxyles, cette tendance s'inverse (Mazza et Brouillard, 1987a).

Tableau 7 : exemples de sucres et acides communément trouvés dans la nature, intervenant dans la glycosilation et acylation des anthocyanes

Glycosilation (position 3 et 5)	Acylation (estérification du groupe OH des sucres)
Glucose	Acide p-coumarique
Arabinose	Acide férulique
Xylose	Acide caféique
Galactose	Acide acétique
Rhamnose	Acide malonique
Rutinose	Acide succinique
Sambubiose	

La présence des sucres augmente la solubilité dans l'eau des anthocyanes. L'acylation (estérification) des substituants des sucres avec des acides organiques crée une variation supplémentaire possible dans la structure des anthocyanes. L'acylation commune est effectuée par les acides cinnamiques (p-coumarique, caféique et férulique) et les acides aliphatiques (acétique, malonique et succinique) (Tableau 7) (Brouillard, 1993).

Quatre anthocyanes ont été identifiées dans les variétés d'*H. sabdariffa* : la delphinidine 3-O-sambubioside, la cyanidine 3-O-sambubioside, la delphinidine 3-O-glucoside et la cyanidine 3-O-glucoside (Palé *et al.*, 2004) (Figure 6).

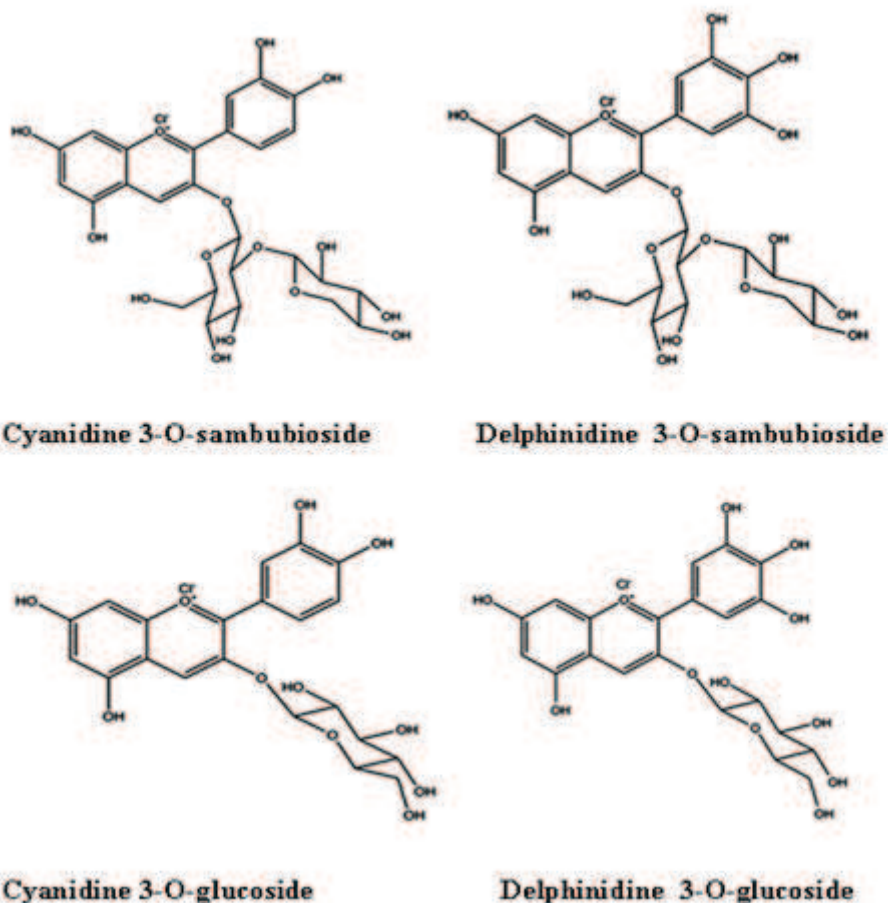


Figure 6 : structure des anthocyanes identifiées dans diverses variétés d'*H.sabdariffa* (Cisse *et al.*, 2009b)

Les concentrations de ces 4 anthocyanes dans un extrait aqueux d'hibiscus sont décrites par Sindi *et al.* (2014) : 48% de delphinidine 3-O-sambubioside, 45% de cyanidine 3-O-sambubioside, 5% cyanidine 3-O-glucoside et 2% de delphinidine 3-O-glucoside. Par contre, selon Palé *et al.* (2004) et Cisse *et al.* (2009b), la quantité en delphinidine 3-O-sambubioside varie de 60 à 70 % et la cyanidine 3-O-sambubioside représente 30 à 40 % des anthocyanes.

2. Stabilité des anthocyanes

Les anthocyanes sont très instables. La stabilité de leur couleur est fortement affectée par des facteurs endogènes quand elles se trouvent en solution : le pH, les ions métalliques, les enzymes, la structure chimique de l'anthocyane, la concentration en anthocyanes, la présence de co-pigments, les sucres etc., ainsi que

par des facteurs exogènes principalement la température, la lumière et l'oxygène (Bobbio et Mercadante, 2008 ; Francis, 1989 ; Wilska-Jeszka, 2007).

2.1 Facteurs endogènes

2.1.1 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 les solutions aqueuses, les anthocyanes existent sous forme d'un mélange de différentes structures chimiques en équilibre : le cation flavylum (rouge), la base quinonique (bleue), la pseudo-base carbinol (incolore) et la chalcone (incolore à légèrement jaune) (Figure 7).

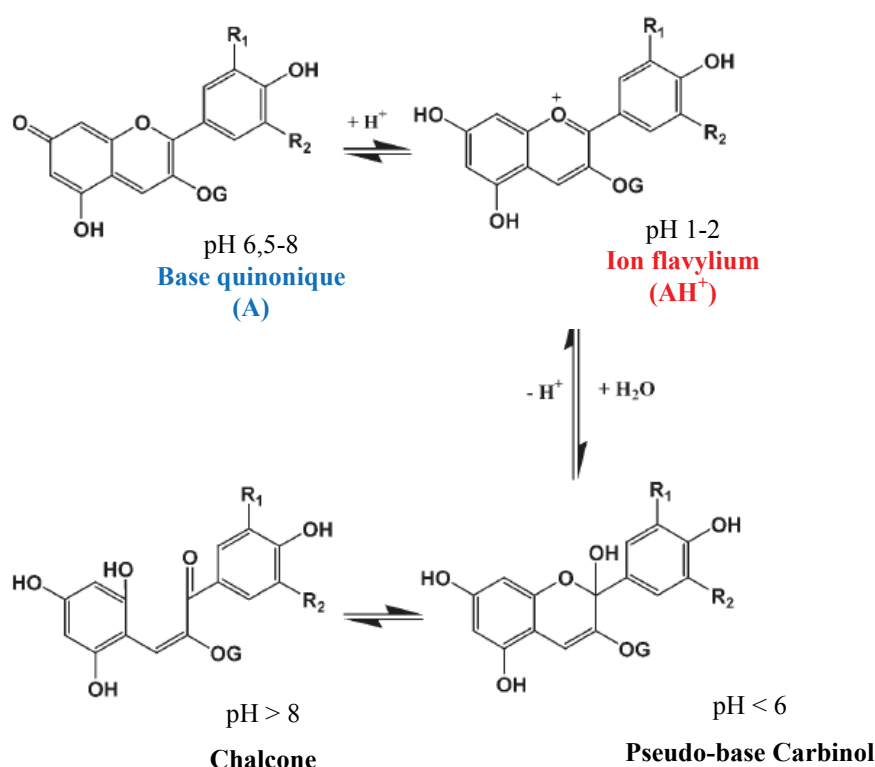


Figure 7 : principales formes des anthocyanes en équilibre existant en milieu aqueux (Brouillard, 1982)

Dans un milieu très acide (pH 1-2) le cation flavylum est l'espèce prédominante. Une perte rapide de protons du cation flavylum a lieu lorsque le pH augmente (pH 6,5-8) en décalant l'équilibre vers la forme quinonique (da Costa *et al.*, 1998). Jusqu'à pH 6, le cation flavylum est hydraté par une attaque nucléophile de l'eau conduisant à l'équilibre à la forme incolore carbinol. Celle-ci à son tour, peut générer la forme chalcone qui est aussi incolore (pH > 8) (Brouillard, 1982 ; da Costa *et al.*, 1998).

Les constantes d'équilibre associées à ces changements qui se produisent dans les anthocyanes en solution aqueuse sont exprimées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : expressions des constantes d'équilibre des anthocyanes dans des solutions aqueuses (Lopes *et al.*, 2007)

Type d'équilibre	Mécanisme réactionnel	Constante d'équilibre
$\begin{array}{c} \xrightarrow{k_a} \\ \text{AH}^+ \rightarrow \text{A} + \text{H}^+ \\ \xleftarrow{k_{-a}} \end{array}$ <p>Acide-base</p>	<p>Deprotonation de l'ion flavylum, formation de la base quinonique</p>	$K_a = \frac{[\text{A}] \cdot a_{\text{H}^+}}{[\text{AH}^+]}$
$\begin{array}{c} \xrightarrow{k_h} \\ \text{AH}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{B} + \text{H}^+ \\ \xleftarrow{k_{-h}} \end{array}$ <p>Hydratation</p>	<p>Hydratation de l'ion flavylum, formation de la pseudo-base carbinol</p>	$K_h = \frac{[\text{B}] \cdot a_{\text{H}^+}}{[\text{AH}^+]}$
$\begin{array}{c} \xrightarrow{k_t} \\ \text{B} \rightarrow \text{C} \\ \xleftarrow{k_{-t}} \end{array}$ <p>Tautomérisation</p>	<p>Tautomérisation de la pseudo-base carbinol, formation de la chalcone</p>	$K_t = \frac{[\text{C}]}{[\text{B}]}$

a_{H^+} représente l'activité de l'ion hydronium

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). Selon Dougall et Baker (2008), une valeur de K_h faible montre que la concentration de l'ion flavylum est élevée et qu'il a une faible tendance à perdre sa

couleur par hydratation (dans un milieu aqueux avec une acidité constante). Généralement des valeurs de K_h supérieures à K_a signifient que la forme incolore (pseudo-base carbinol) est prédominante. L'étude de ces constantes conduira à une compréhension plus détaillée du mécanisme par lequel la réaction d'hydratation des anthocyanes majoritaires d'hibiscus et la perte résultante de sa couleur ont lieu.

Les quantités relatives des cations flavylum (AH^+), de la base quinonique (A), du carbinol (B) et de la chalcone (C) en équilibre varient en fonction du pH et de la structure de l'anthocyane. La forme B est aussi en équilibre avec la cis-chalcone (Cc), elle-même en équilibre très lent avec la trans-chalcone (Ct). Ces équilibres sont caractérisés respectivement par les constantes d'acidité et d'hydratation globale K_a et K'_h . Pour les anthocyanes communs 3-O-glycoside ou 3,5-di-O-glycoside, 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 8 pour la malvidine 3-O-glycoside (Brouillard, 1982).

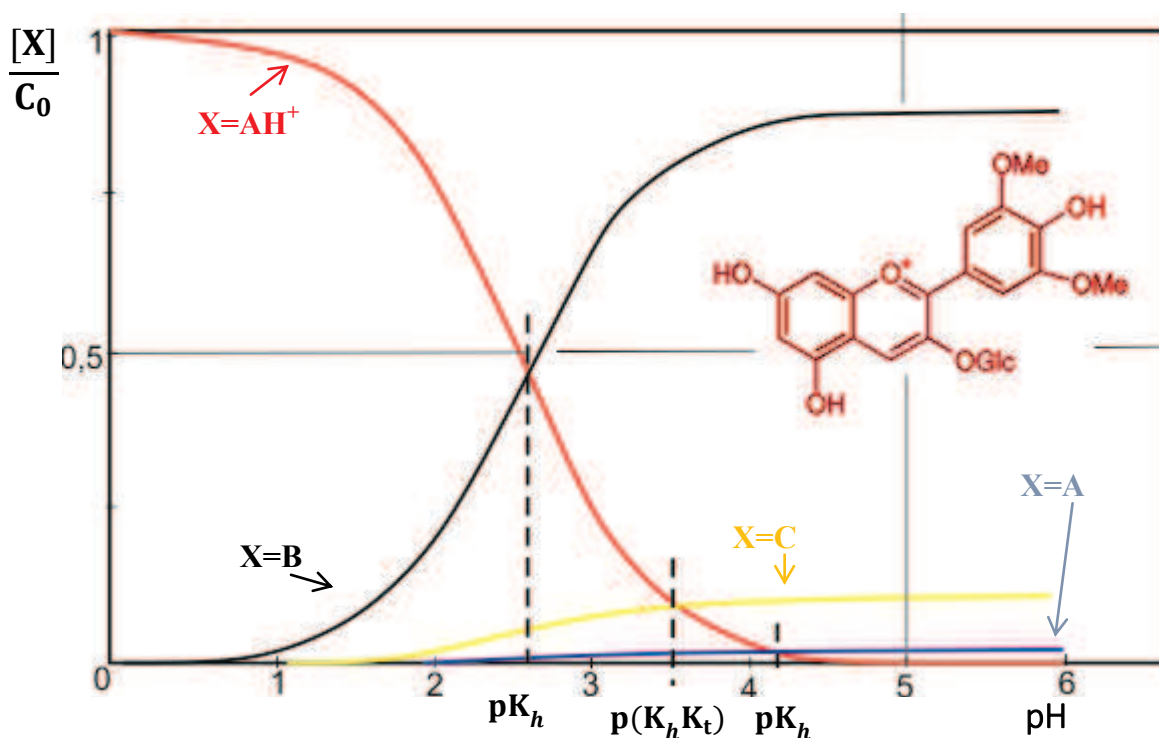


Figure 8 : distribution des différentes formes en équilibre de la malvidine-3-O-glycoside selon le pH. X quantité relative de la forme en équilibre ; AH^+ cation flavylum ; A base quinonoïdale ; B carbinol et C chalcone (Brouillard, 1982)

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 pseudobase carbinol. Pour des valeurs de pH supérieures à 6, deux espèces peuvent être observées, la base quinonique et la chalcone, (Brouillard, 1982 ; da Costa *et al.*, 1998).

Selon Brouillard (1982) le spectre d'absorption dans la zone du visible de la malvidine 3-O-glucoside présente différents maxima d'absorption en fonction du pH comme illustré dans la Figure 9.

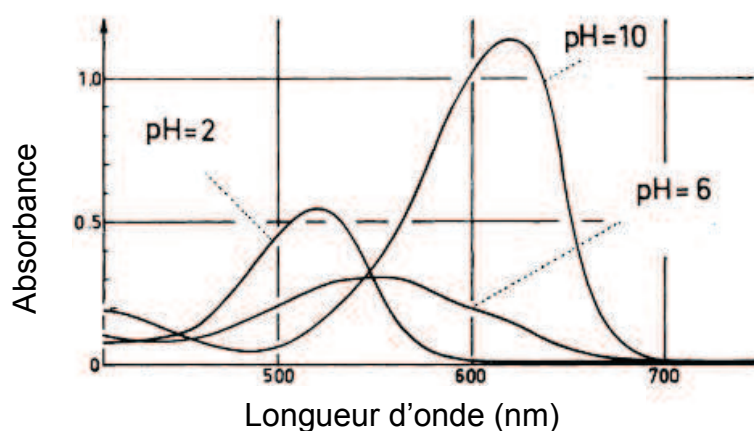


Figure 9 : spectre d'absorption visible de la malvidine 3-O-glucoside à pH 2, 6 et 10 (25 °C) (Brouillard, 1982)

La forme structurale majoritaire en milieu aqueux induit les mécanismes réactionnels possibles de l'anthocyane. En effet, les différentes formes présentent des réactivités différentes. Ainsi la connaissance de ces constantes d'équilibre est un atout majeur pour l'étude de la stabilité des anthocyanes. Cependant, les paramètres du milieu tel que le pH ou encore la température modifient la valeur de ces constantes. D'après des études réalisées sur la détermination des constantes d'hydratation K_h et des constantes d'acidité K_a , les valeurs sont variables selon la structure des anthocyanes et la nature de leurs substituant (Dougall et Baker, 2008).

En général, les constantes d'équilibre des anthocyanes sont déterminées par une méthode de saut de pH (pH-jump) qui permet le suivi des cinétiques d'hydratation en fonction du pH (Brouillard et Dubois, 1977) ou par simple titrage sur des solutions totalement équilibrées (Stintzing *et al.*, 2002). La première méthode permet de

déterminer à la fois K_a et K_h tandis que la seconde ne fournit que la somme $K_a + K_h$. Les changements de couleur sont suivis par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde donnée, habituellement à 520 nm (Stintzing *et al.*, 2002). Récemment, une équipe brésilienne a enregistré les valeurs d'absorbance à toutes les longueurs d'onde du spectre UV-visible et a utilisé la Résolution Multivariée de Courbes (MCR) pour obtenir la concentration de chaque forme à l'équilibre après déconvolution des spectres (Marco *et al.*, 2011). Cependant, cette technique n'a jamais été testée sur des anthocyanes purs ni comparée aux valeurs obtenues avec la méthode à une longueur d'onde donnée.

Dans le Tableau 9 sont présentées quelques exemples trouvés dans la littérature pour le pK_a et pK_h ($pK = -\log K$).

Tableau 9 : quelques valeurs de constantes d'acidité et d'hydratation d'anthocyanes sous différentes conditions

Structures différentes	pK_h	Substituant différents	pK_h	Températures différentes	pK_h
Malvidine 3-O-glucoside ^a	2,60 (0,01)	Cyanidine 3-O-glucoside ^b	3,01 (0,04)	Malvine ^c à 4 °C	1,85 (0,02)
Cyanidine-3-O- glucoside ^b	3,01 (0,04)	Cyanidine 3-O-xylosyl- galactoside ^b	3,13 (0,02)	Malvine ^c à 25 °C	1,91 (0,03)
	pK_a		pK_a		
Delphinidine 3-O-glucoside ^d	3,8 (0,1)	Cyanidine 3,5- diglucoside ^e	4,03 (0,02)	-	-
Cyanidine 3-O-glucoside ^d	3,8 (0,1)	Cyanidine 3-rutinoside ^e	3,58 (0,03)	-	-

^aBrouillard et Delaporte (1977) ; ^bTimberlake et Bridle (1967) ; ^cBrouillard et Dubois (1977) ; ^dLeydet, *et al.*, (2012) et ^eFigueiredo, *et al.*, (1996)

Les structures des anthocyanes présentées dans le Tableau 9 se différencient par la nature des substituants méthyle, hydroxyle ainsi que par les sucres liés à l'aglycone. Ces substituants ont une influence relativement faible sur les constantes thermodynamiques des anthocyanes, ce qui est corroboré par Leydet *et al.* (2012). Une légère augmentation du pK_h de la malvidine est observée quand la température

augmente et d'après Brouillard et Dubois (1977), les formations des formes hydratée (K_h) et quinonique (K_a) pour cette anthocyane sont endothermiques.

Des études manquent concernant ces constantes d'équilibre pour les anthocyanes spécifiques des calices d'*Hibiscus sabdariffa*. Une étude sur les anthocyanes totales extraites des calices d'une autre espèce d'hibiscus (*Acetosella* Welw ex Finicius) a conduit à une valeur de pK_a de 4,24 (0,04) (Março et Scarminio, 2007).

2.1.2 Ions Métalliques

La présence de métaux de transition peut catalyser des phénomènes d'oxydation des polyphénols (Clifford, 2000).

Il est connu que les ions métalliques peuvent interagir avec les anthocyanes au travers des groupes hydroxyles (Figure 10) (Dangles et Elhajji, 1994).

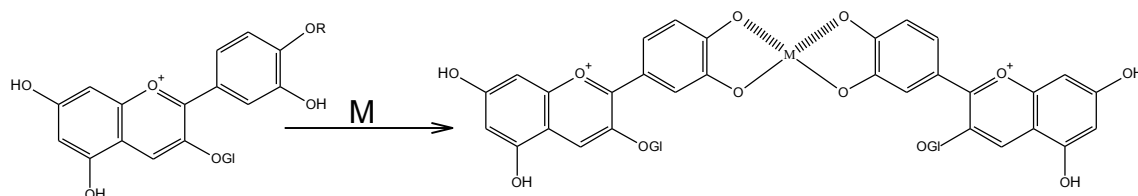


Figure 10 : complexation métallique des anthocyanes (Esparza *et al.*, 2004)

Les métaux les plus courants dans la complexation conduisant à une dégradation des anthocyanes sont l'étain (Sn), le cuivre (Cu), le fer (Fe), l'aluminium (Al), le magnésium (Mg) et le potassium (K) (Starr et Francis, 1974). La capacité de chélation du métal avec des polyphénols est liée à la présence d'ortho-dihydroxy polyphénols (o-diphénol), c'est à dire, des molécules portant des groupes catéchol ou galloyl (

Figure 11a). Après cette chélation il peut y avoir une formation d'espèce quinone par réaction rédox (

Figure 11b). Seules la cyanidine, delphinidine et pétunidine, qui ont plus d'un groupe hydroxyle libre sur le noyau B, sont capables de chélation des métaux (Osawa, 1982).

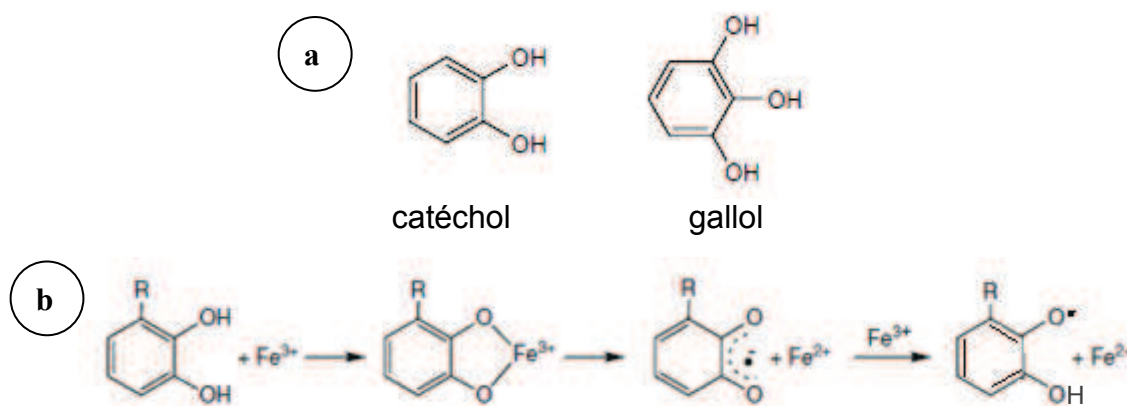


Figure 11 : O-diphénols (a) sensés être chelatés par le Fe^{3+} pour former des quinones par phénomène d'oxydation (b) (Perron *et al.*, 2010)

Danilewicz (2003) a conclu que l'interaction directe de composés phénoliques et de l'oxygène ne se produit pas à moins d'être catalysée par des ions de métaux de transition. Le rôle des métaux en tant que catalyseurs ou initiateurs de réactions d'oxydation a été bien étudié mais les résultats dans le vin ont été variables. Le fer, cuivre et manganèse comptent parmi les métaux les plus actifs dans le brunissement des vins (Cacho *et al.*, 1995).

Benítez *et al.* (2002) ont observé la sensibilité au brunissement du vin, par ajout de métaux à différentes concentrations ($12,23 \text{ mg.L}^{-1}$ pour le fer, $0,21 \text{ mg.L}^{-1}$ pour le cuivre et $1,64 \text{ mg.L}^{-1}$ pour le manganèse). Ils ont obtenu une absorbance à 420 nm 2 fois plus élevée que la référence au bout de 5 jours à température ambiante.

2.1.3 Enzymes

La polyphénol oxydase (PPO) est un nom générique pour un groupe d'enzymes capables de catalyser les réactions (brunissement enzymatique) de plusieurs phénols pour produire des o-quinones. Elle accomplit l'o-hydroxylation de monophénols (activité monophénolase) et l'oxydation de l'o-diphénol en o-quinone (activité de diphénolase) avec de l'oxygène comme oxydant primaire (Yoruk et Marshall, 2003).

Le brunissement enzymatique se produit en 2 étapes : la première est l'oxydation enzymatique de monophénols ou o-diphénols pour donner des o-quinones, suivie par des réactions de condensation ou de polymérisation (Yoruk et Marshall, 2003).

Il est bien connu que la PPO a une faible affinité avec les anthocyanes. Ceci est probablement dû à la présence de sucre (liée à l'aglycone) causant une gêne stérique (Jiang, 2000). La PPO impliquée dans la dégradation des anthocyanes dans la myrtille, fraise, prune et raisin a été largement étudiée. En l'absence de phénols, la dégradation des anthocyanes par la PPO est très lente, mais elle croît rapidement avec l'augmentation de la concentration en phénol (Kader *et al.*, 1999). Sakamura et Obata (1963) ont montré que la présence d'acide chlorogénique a augmenté le taux de dégradation de la delphinidine 3-*p*-coumaroylrutinoside-5-glucoside par la PPO (98% au lieu de 53% en l'absence d'acide chlorogénique).

Wesche- Ebeling et Montgomery (1990) ont montré que la présence de la catéchine augmente le taux de dégradation des anthocyanes de fraises par la PPO. Ils ont proposé que la réaction de brunissement était due à la copolymérisation des anthocyanes avec des produits de condensation formés par des réactions quinone-phénol. Cela conduirait à la formation de pigments bruns, tels que mélanine et phlobatanins (dimères ou trimères d'unités flavonoïdes), masquant la couleur rouge dans les fraises. Certains pigments polymériques contiennent des unités quinone répétées qui pourraient être responsables d'une grande absorbance à 500 nm (Wesche-Ebeling et Montgomery, 1990).

Selon Kader *et al.* (1999), le taux de dégradation des anthocyanes par la PPO est lié à leur structure. Les anthocyanes o-diphénoliques (delphinidine 3-glucoside et pétunidine 3-glucoside) sont plus rapidement oxydés que les autres (pélargonidine 3-glucoside). Les anthocyanes non o-diphénoliques ne devraient pas être sensibles à l'oxydation couplées mais peuvent réagir avec des quinones ou des produits secondaires d'oxydation pour former des copolymères (Kader *et al.*, 1999).

La peroxydase (POD) est une enzyme qui appartient au groupe des oxydoréductases, largement répandue dans le règne végétal. En présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), la POD est capable d'oxyder des composés o-diphénoliques en leurs o-quinones correspondantes, qui sont ensuite

polymérisées (Kader *et al.*, 2002). Les deux enzymes, PPO et POD, sont impliquées dans le brunissement enzymatique des tissus végétaux. La PPO semble être la principale enzyme impliquée dans ces réactions mais le rôle de la POD dans le brunissement enzymatique n'est pas encore bien établi (Kader *et al.*, 2002). Le mécanisme de la dégradation des anthocyanes par la POD reste inconnu. Peu d'études ont été consacrées à ce sujet puisque l'activité de la POD ne contribue pas significativement à la dégradation des anthocyanes dans les fruits (Kader *et al.*, 2002).

2.1.4 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 pélagonidine 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 OCH₃) est moins stable que la péonidine 3-glucoside (1 OH et 1 OCH₃) (Cabrita *et al.*, 2000).

L'augmentation de la méthylation des groupes hydroxyles affaiblit la stabilité des anthocyanes, notamment en position C'4 et C'5 du noyau B (Mazza et Brouillard, 1987a). Dans une solution tamponnée à pH 3, après 8 j 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'5 (Cabrita *et al.*, 2000).

Le type d'unité glycosyle, attaché à l'aglycone, peut également influencer la stabilité des anthocyanes. Bronnum-Hansen et Flink (1985) ont rapporté que les anthocyanes

avec un diholoside (sambubiose) étaient plus stables que les anthocyanes monoglycosilées.

2.1.5 Concentration en anthocyanes

La concentration en anthocyanes est également un facteur qui affecte leur stabilité (Giusti and Wrolstad, 2003). Son augmentation favorise une plus grande stabilité de la couleur. La stabilité de la couleur du sirop de fraise est grandement améliorée par l'augmentation de la concentration des anthocyanes. Il a été observé que l'effet de la concentration des anthocyanes totaux avait plus d'impact sur la stabilité de la couleur que l'ajout de différents types d'anthocyanes individuels (Skrede *et al.*, 1992).

2.1.6 Copigmentation

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). Certaines études suggèrent que la copigmentation des anthocyanes avec d'autres composés (copigments) est le principal mécanisme de stabilisation de la couleur dans les plantes (Davies and Mazza, 1993; Mazza et Brouillard, 1990).

Les copigments sont des systèmes riches en électrons π qui sont capables de s'associer avec des ions flavylum, assez pauvres en électrons. Cette association hydrophobe protège le chromophore de l'attaque nucléophile de l'eau dans la position 2 de l'ion flavylum (Matsufuji *et al.*, 2003). Les copigments peuvent être des alcaloïdes, flavonoïdes, acides aminés, acides organiques, nucléotides, polyosides, métaux ou d'autres anthocyanes (Matsufuji *et al.*, 2003).

Le phénomène de copigmentation produit un effet bathochrome. La longueur d'onde maximale dans le visible (λ_{max}) est décalée vers une longueur d'onde plus élevée. Il s'accompagne également souvent d'un effet hyperchrome, dans lequel l'intensité de la couleur des anthocyanes augmente par copigmentation (Asen *et al.*, 1972). La Figure 12 montre la variation de l'ordre de 20 nm de la longueur d'onde d'absorption maximale (déplacement bathochrome) et une augmentation d'un facteur 2 de l'intensité de la couleur (effet hyperchrome) pour la cyanidine 3-glucoside copigmentée avec de l'acide rosmarinique (Asen *et al.*, 1972).

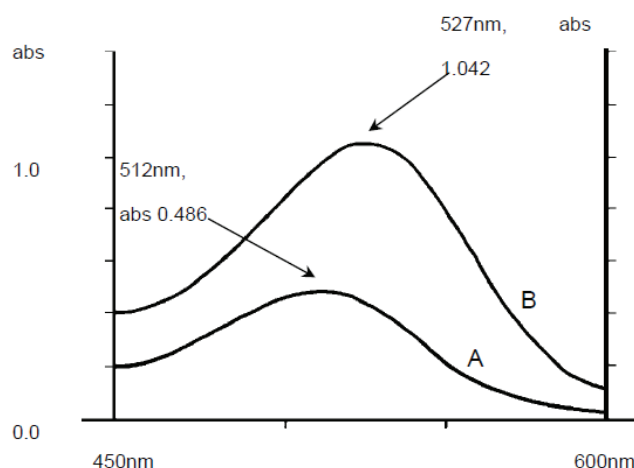


Figure 12 : effet hyperchrome et bathochrome de la copigmentation. A Cyanidine 3-glucoside et B Cyanidine 3-glucoside + acide rosmarinique (Rein, 2005)

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 (Timberlake et Bridle, 1967).

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.*, 1993a).

Selon Dangles et Brouillard (1992), le résultat de la copigmentation est basé sur 2 effets : (1) la formation du complexe π - π qui provoque des changements dans les propriétés spectrales dans l'ion flavylium en augmentant l'intensité de l'absorption (effets bathochrome et hyperchrome) ; (2) la forme flavylium est stabilisée par le complexe π à partir d'une réaction en équilibre (flavylium + pyrocatechol) qui déplace vers l'augmentation de la couleur rouge (complexe de transfert de charge) (Figure 13).

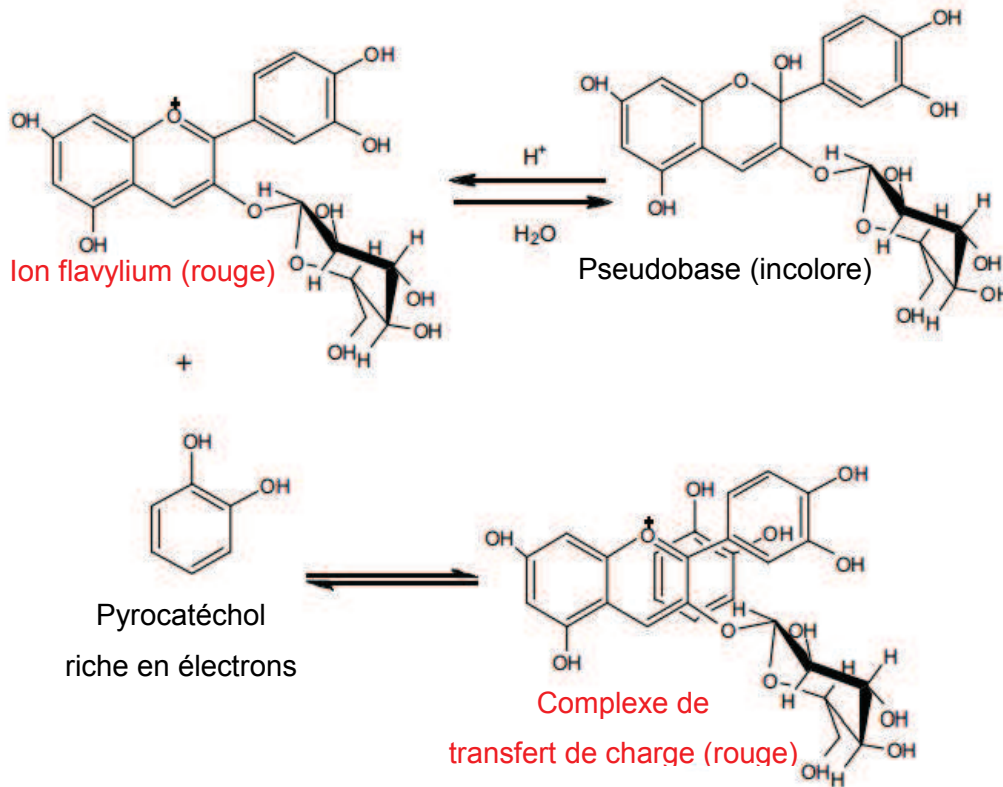


Figure 13 : exemple de copigmentation intermoléculaire des anthocyanes (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009)

2.1.7 Sucres

Les sucres sont naturellement présents dans les fruits mais ils peuvent être ajoutés au cours des processus de transformation (cas des nectars, concentrés, sirops, etc). Les sucres, ainsi que leurs produits de dégradation, sont connus pour diminuer la stabilité des anthocyanes (Meschter, 1953). Dans une étude réalisée par Daravingas et Cain (1968), tous les sucres testés (saccharose, fructose, glucose et xylose) ont augmenté la vitesse de dégradation des anthocyanes dans un milieu modèle à pH 3 après un mois de stockage à 50 °C. Parmi les produits typiques de dégradation du sucre, le furfural accélère la dégradation des anthocyanes plus nettement que l'hydroxy-méthylfurfural (Meschter, 1953).

Les réactions des anthocyanes avec ces produits de dégradation des sucres et l'acide ascorbique, engendrent la formation de polymères et de pigments bruns (Meschter, 1953).

2.2 Facteurs exogènes

2.2.1 Température

Lors des procédés de chauffage ou pendant le stockage, la stabilité des anthocyanes est affectée principalement par la température qui accélère toutes les réactions de dégradation (Adam et Ongley, 1973 ; Palamidis et Markakis, 1978). L'élévation de température à des pH de 2 à 4 induit la perte des groupements glycosylés des anthocyanes, par hydrolyse de la liaison glycosidique. Cela conduit à leur dégradation et une perte de couleur, puisque les formes aglycones sont beaucoup moins stables que leurs formes glycosylées (Adams, 1973).

Cisse *et al.* (2012) ont étudié les pertes en anthocyanes dans des extraits d'*Hibiscus sabdariffa* lors de traitements thermiques et durant le stockage. Lors d'une pasteurisation à 90°C pendant 5 min, ils ont observé des pertes en anthocyanes de 4%. De plus, ils ont remarqué qu'un stockage pendant six mois à des températures de 4, 20, 30, 37 et 40°C entraîne des pertes respectives de 33, 45, 60, 70 et 80%.

La dégradation thermique des anthocyanes peut conduire à une grande variété d'espèces en fonction de la sévérité du chauffage. Les principaux mécanismes identifiés dans la littérature montrent une scission des noyaux A et B des anthocyanes. Ces différents mécanismes de dégradation des anthocyanes sont résumés dans la Figure 14 (Hrazdina, 1971; Jurd et Asen, 1966; Patras *et al.*, 2010 ; Sadilova *et al.*, 2006 ; Salas *et al.*, 2003 ; Schwarz *et al.*, 2003 ; Seeram *et al.*, 2001 ; Sun *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013).

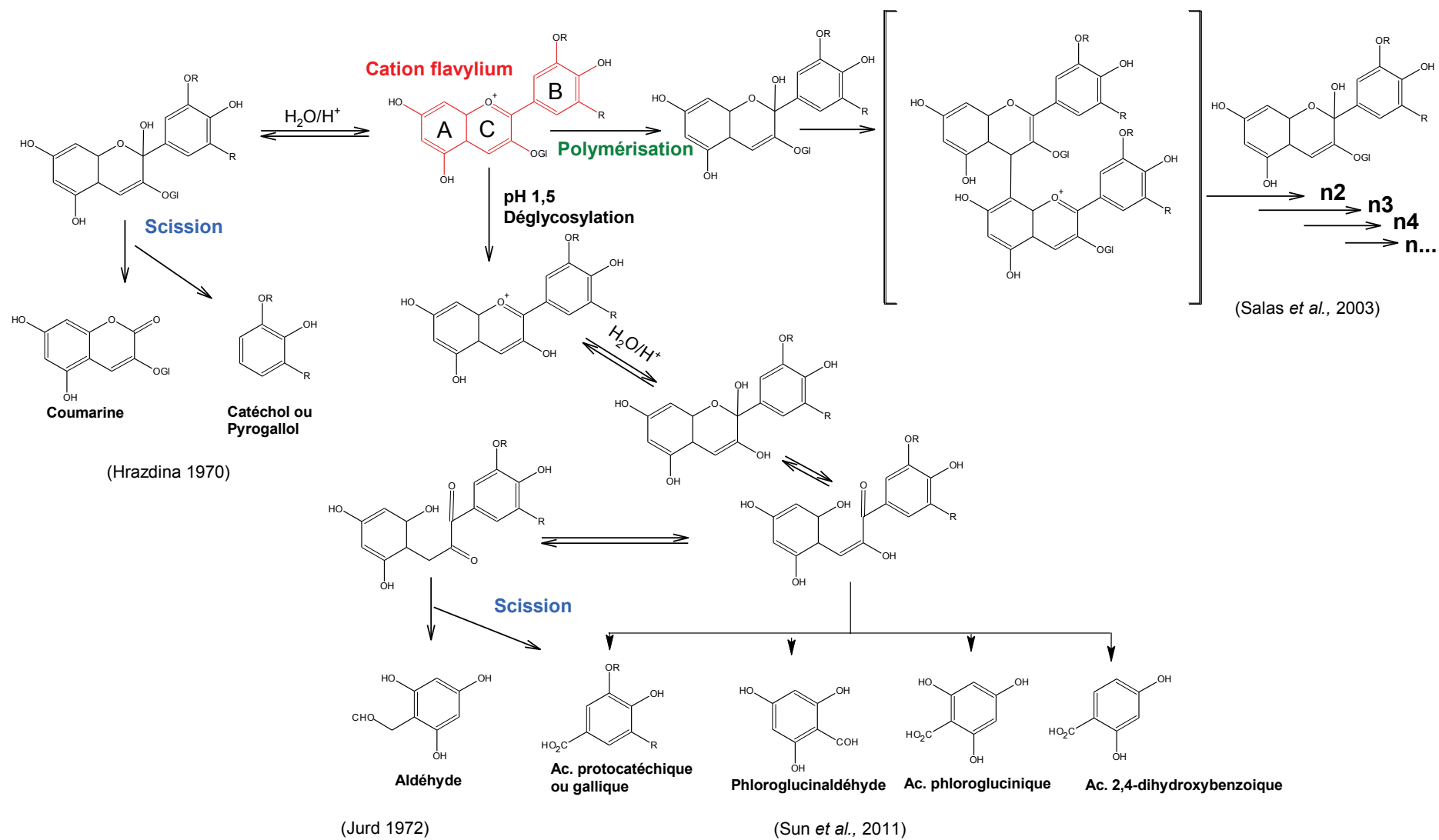


Figure 14 : quelques mécanismes de dégradation thermique des anthocyanes en milieu modèle cités dans la littérature

En majorité, la scission des noyaux A et B des anthocyanes conduit à des acides phénols tels que l'acide protocatéchique (pour la cyanidine) ou l'acide gallique (pour la delphinidine) et au phloroglucinaldéhyde ou ses dérivés. A pH acide, le mécanisme passe d'abord par une déglycosylation de l'aglycone suivie d'une hydratation formant ainsi un hémiacétal conduisant à la forme ouverte de l'aglycone (chalcone) qui est la première étape dans la dégradation thermique des anthocyanes (Adams, 1973 ; Markakis *et al.*, 1957). Selon Markakis *et al.* (1957), le noyau hétérocyclique de la pseudobase incolore s'ouvre pour former une chalcone incolore (avant que l'hydrolyse de la liaison glycosidique ne se produise). La chalcone est ensuite transformée en un dérivé de glucoside de coumarine après clivage et perte du noyau B. Ce mécanisme a été proposé en réponse à l'absence d'anthocyanidine détectable pendant la décomposition de la pélargonidine-3-glucoside purifiée à pH 2 et 3,4 (Markakis *et al.*, 1957).

Adams (1973) a proposé un autre mécanisme. Les anthocyanes chauffés dans une plage de pH de 2 à 4, subissent d'abord une hydrolyse du sucre suivie d'une conversion de l'anthocyanidine en chalcone, ce qui donne par la suite une α -dicétone (Melanie *et al.*, 2007 ; Williamson et Clifford, 2010) qui est très réactive à pH > 3 et susceptible de se décomposer en acide phénolique (Tableau 10) et aldéhyde (phloroglucinolaldéhyde) (Fleschhut *et al.*, 2006 ; Keppler et Humpf, 2005 ; Surangi *et al.*, 2013).

Tableau 10 : produits de dégradation du noyau B de différentes anthocyanidines

Anthocyanidine	Produit de dégradation du noyau B (acide phénol)
Cyanidine	Acide protocatéchique
Delphinidine	Acide gallique
Malvidine	Acide syringique
Pélargonidine	Acide 4-hydroxybenzoïque
Péonidine	Acide vanillique
Pétunidine	Acide 3-méthylgallique

Les voies de polymérisation restent encore indéterminées mais de précédentes études évoquent souvent la formation de « polymères bruns » (Kader *et al.*, 1999)

issus de la dégradation des anthocyanes par condensation ou polymérisation. Une voie de polymérisation a été proposée par Salas *et al.* (2003) faisant intervenir des anthocyanes glycosylés sous forme hydratée. De même, une voie de condensation entre un anthocyane et l'acide caféique induisant une perte de dioxyde de carbone est présentée par Schwarz *et al.* (2003). Mais les anthocyanes sont des molécules pouvant réagir de manières différentes du fait de leur structure chimique. C'est pourquoi l'étude des mécanismes réactionnels entre les anthocyanes et les différents composants de la matrice naturelle est extrêmement complexe.

Il a été montré que le mécanisme de dégradation des anthocyanes est dépendant de la nature de l'anthocyane (Hrazdina, 1971). Hrazdina (1971) a identifié un diglycoside de coumarine en tant que produit de dégradation commun de la malvidine, cyanidine, delphinidine, pétunidine, et péonidine 3,5-diglycoside dans la gamme de pH 3 à 7. Cependant, les anthocyanidine-3-glycoside ne forment pas de dérivés de la coumarine.

2.2.2 La teneur en oxygène

L'oxygène présent dans une matrice alimentaire peut être modifié au cours d'un procédé. Sa présence est un autre facteur qui affecte la stabilité des anthocyanes en amplifiant l'impact d'autres processus de dégradation. Son élimination dans une matrice protège contre la dégradation thermique. La présence d'oxygène et une température élevée est la combinaison la plus favorable à la détérioration de la couleur de différents jus de fruits et d'anthocyanes (Nebesky *et al.*, 1949).

L'oxygène associé à l'acide ascorbique est préjudiciable à la stabilité de l'anthocyane du jus de canneberge (Starr et Francis, 1968). L'effet délétère de l'oxygène sur les anthocyanes peut avoir lieu à travers le mécanisme de l'oxydation directe et/ou par oxydation indirecte, dans lequel les composants oxydés du milieu réagissent avec les anthocyanes, donnant lieu à des produits incolores ou bruns (Jackman *et al.*, 1987).

En présence d'oxygène, d'enzymes et/ou de fer, les anthocyanes peuvent se dégrader selon un mécanisme mettant en jeu des intermédiaires de type quinone, très réactives. Ces composés peuvent par la suite donner lieu à des réactions de condensation avec les composés présents dans le milieu conduisant à la formation

de polymères bruns selon la Figure 15 (Danilewicz, 2003 ; Kader *et al.*, 1999 ; Sarni-Manchado *et al.*, 1997).

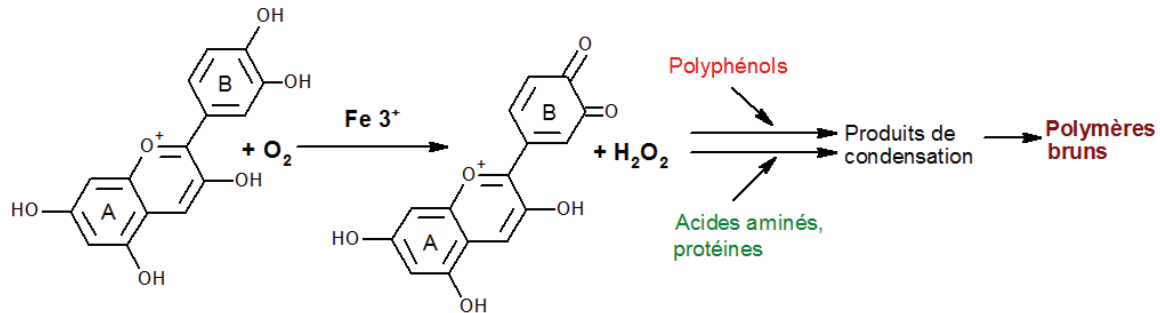


Figure 15 : schéma de formation des polymères bruns (Perron *et al.*, 2010)

La complexité des produits obtenus dans ces réactions de polymérisation ne permet pas leur identification formelle. Certaines techniques, comme la mesure de l'indice de brun ou du pourcentage de couleur polymérique, permettent d'évaluer les changements dans la composition et la couleur des extraits (Brownmiller *et al.*, 2008 ; Hager *et al.*, 2008).

3. Cinétique de dégradation des anthocyanes

La modélisation cinétique est généralement utilisée pour prédire l'influence des traitements sur les paramètres de qualité critiques (couleur) (Patras *et al.*, 2010).

La cinétique réactionnelle des anthocyanes permet de comprendre la façon dont différentes conditions expérimentales peuvent influencer la vitesse d'une réaction chimique et donner des informations sur le mécanisme réactionnel. La construction de modèles mathématiques peut également décrire les caractéristiques d'une réaction chimique (Cemeroglu *et al.*, 1994).

Par conséquent, les études cinétiques sont nécessaires afin de minimiser le changement indésirable et pour optimiser la qualité de certains aliments.

3.1 Ordre de réaction

Selon de nombreux auteurs la dégradation des anthocyanes suit une cinétique réactionnelle de premier ordre (équation 1) (Alighourchi et Barzegar, 2009 ; Ioannou *et al.*, 2012 ; Krifi *et al.*, 2000).

$$\frac{d [C]}{dt} = -k [C]^n \quad (1)$$

Où [C] est la concentration en anthocyanes (mol.L⁻¹) à un temps t (s), k la constante de vitesse (s⁻¹) et n l'ordre de la réaction qui est 1 pour les réactions de premier ordre.

3.2 Constantes cinétiques au cours des procédés thermiques et du stockage

Les paramètres cinétiques, notamment l'énergie d'activation (Ea) et la constante de vitesse (k) de la dégradation des anthocyanes, sont relatés par plusieurs auteurs (Tableau 11).

Tableau 11 : quelques paramètres cinétiques de dégradation des anthocyanes

Type de produit	Composés	Conditions opératoires	Paramètres cinétiques	Références
Extrait de bissap (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Anthocyanes Totaux	Stockage 182 j (4-45°C)	k _{4°C} = 0,58.10 ⁻⁷ s ⁻¹ k _{20°C} = 0,98.10 ⁻⁷ s ⁻¹ k _{30°C} = 1,44.10 ⁻⁷ s ⁻¹ k _{37°C} = 1,74.10 ⁻⁷ s ⁻¹ k _{45°C} = 1,97.10 ⁻⁷ s ⁻¹ Ea = 22,66 kJ.mol ⁻¹	(Cisse <i>et al.</i> , 2012)
Jus concentré de mûre (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	Anthocyanes Totaux	Stockage 32 j (5-37°C)	k _{5°C} = 33,3.10 ⁻⁶ s ⁻¹ k _{25°C} = 72,00.10 ⁻⁶ s ⁻¹ k _{37°C} = 985.10 ⁻⁶ s ⁻¹ Ea = 75,5 kJ.mol ⁻¹	(Kirca et Cemeroglu, 2007)
Jus d'orange sanguine (<i>Citrus sinensis</i> L)	Cyanidine 3-O-glucoside	Stockage 10 j (4 et 20°C)	k _{4°C} = 2,08.10 ⁻⁷ s ⁻¹ k _{20°C} = 5,06.10 ⁻⁷ s ⁻¹	(Torres <i>et al.</i> , 2011)
Jus d'orange sanguine (<i>Citrus sinensis</i> L)	Anthocyanes Totaux	Stockage 60 j (5,20 et 37°C)	k _{5°C} = 1,43.10 ⁻⁷ s ⁻¹ k _{20°C} = 8,26.10 ⁻⁷ s ⁻¹ k _{37°C} = 37,70.10 ⁻⁷ s ⁻¹ Ea = 73,2 kJ.mol ⁻¹	(Kirca et Cemeroglu, 2003)

Jus concentré de mûre (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	Anthocyanes	Stockage 60 j (5, 25 et 37°C)	$k_{5^{\circ}\text{C}} = 0,23.10^{-7} \text{ s}^{-1}$	(Wang et Xus, 2007)
	Totaux		$k_{25^{\circ}\text{C}} = 0,25.10^{-7} \text{ s}^{-1}$ $k_{37^{\circ}\text{C}} = 6,84.10^{-7} \text{ s}^{-1}$ $E_a = 75,50 \text{ kJ.mol}^{-1}$	
Jus de grenade	Anthocyanes	Stockage 210 j (4, 20 et 37°C)	$k_{4^{\circ}\text{C}} = 0,67.10^{-7} \text{ s}^{-1}$	(Alighourchi et Barzegar, 2009)
	Totaux		$k_{20^{\circ}\text{C}} = 1,78.10^{-7} \text{ s}^{-1}$ $k_{37^{\circ}\text{C}} = 3,16.10^{-7} \text{ s}^{-1}$	
Extrait de bissap (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Anthocyanes	Traitement thermique 60-100°C (20-120 min)	$k_{60^{\circ}\text{C}} = 10,00.10^{-6} \text{ s}^{-1}$	(Aurelio <i>et al.</i> , 2008)
	Totaux		$k_{70^{\circ}\text{C}} = 16,67.10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $k_{80^{\circ}\text{C}} = 26,67.10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $k_{90^{\circ}\text{C}} = 60,00.10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $k_{100^{\circ}\text{C}} = 131,7.10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $E_a = 66,22 \text{ kJ.mol}^{-1}$	
Jus d'orange sanguine (<i>Citrus sinensis</i> L.)	Anthocyanes	Traitement thermique 70-90°C (0-250 min)	$k_{70^{\circ}\text{C}} = 30,67.10^{-6} \text{ s}^{-1}$	(Kirca et Cemeroğlu, 2003)
	Totaux		$k_{80^{\circ}\text{C}} = 53,67.10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $k_{90^{\circ}\text{C}} = 106,7.10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $E_a = 73,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$	
Jus concentré de mûre (<i>Rubus fruticosus</i> L.)	Anthocyanes	Traitement thermique 60-90°C (10-160 min)	$k_{60^{\circ}\text{C}} = 11,50.10^{-6} \text{ s}^{-1}$	(Wang et Xus, 2007)
	Totaux		$k_{70^{\circ}\text{C}} = 22,00.10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $k_{80^{\circ}\text{C}} = 41,17.10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $k_{90^{\circ}\text{C}} = 65,67.10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $E_a = 58,95 \text{ kJ.mol}^{-1}$	

Il faut noter que les paramètres cinétiques relatifs aux extraits d'hibiscus présentés dans ce tableau représentent une valeur globale et unique pour la totalité des anthocyanes présents dans ces extraits car celles-ci ont été dosées indistinctement par la méthode de pH différentiel. Des études sur les cinétiques (ordre de réaction, constante de vitesse, énergie d'activation) des principaux anthocyanes individuelles d'hibiscus avec exploitation par HPLC sont nécessaires pour mieux comprendre leur stabilité au cours du stockage.

La variation des paramètres cinétiques dans le Tableau 11 peut être expliquée par la différence de gamme de température, la composition des extraits, la teneur en oxygène dissous et la structure des anthocyanes (Alighourchi et Barzegar, 2009 ; Cissé *et al.*, 2009). Les constantes de vitesses sont très variables mais les énergies d'activation sont proches dans la plupart des matrices.

Selon Ioannou *et al.* (2012), la matrice alimentaire peut limiter l'effet du chauffage ou au contraire, induire la dégradation des anthocyanes. La présence d'acide ascorbique plus élevée dans certaines matrices alimentaires peut également affecter la stabilité des anthocyanes au cours du chauffage et du stockage (Ioannou *et al.*, 2012).

La différence de structure des anthocyanes est également un facteur à considérer. En effet, la cyanidine a une stabilité supérieure à celle de la delphinidine (Alighourchi et Barzegar, 2009). Rubinskiene *et al.* (2005) ont démontré que la cyanidine-3-O-rutinoside présente une plus grande stabilité que la delphinidine dans le traitement thermique du cassis.

CHAPITRE II : **Matériels et Méthodes**

1. Matériels

1.1 Matériel végétal

Les calices d'*Hibiscus sabdariffa* (variété VIMTO) utilisés au cours de ce travail ont été récoltés en 2013. Ils proviennent de plantes cultivées dans les régions de Kaolack et de Louga situées respectivement au centre et au nord du Sénégal. Après récolte, les calices ont été manuellement décortiqués et séchés au soleil sur des claies pendant 5 à 10 j. Après séchage, les calices (50 kg) ont été conditionnés dans des sacs en toile de propylène et acheminés au CIRAD (Montpellier) par bateau.

1.2 Réactifs chimiques et composés de référence

Les solvants utilisés (méthanol, acétone, hexane et acétonitrile) sont tous de qualité CLHP, commercialisés par Carlo Erba (Val de Reuil, France). L'eau est de Qualité Milli-Q (Merck Millipore, Allemagne). L'acide formique, le DL-acide malique, l'acide chlorhydrique, le métabisulfite de potassium, la soude, le chlorure de fer, le chlorure de cuivre, le chlorure de manganèse, l'urée, la vanilline, l'acide acétique, l'acide sulfurique ainsi que la résine Amberlite XAD-16 proviennent de Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Le gel Sephadex G-25 provient de Pharmacia (Upsala, Suède).

La delphinidine 3-O-sambubioside, la cyanidine 3-O-sambubioside et l'acide 3-caféoylquinique ont été fournis par Extrasynthèse (Genay, France). L'acide gallique, l'acide protocatéchique, le phloroglucinaldéhyde, la quercétine et le kampférol proviennent de Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France).

2. Méthodes

2.1 Préparation des modèles d'étude

2.1.1 Préparation de l'extrait brut

Les calices sont réduits en poudre à l'aide d'un broyeur électrique (Thermomix Vorwerk, France) puis macérés dans de l'eau déminéralisée (ratio massique calice/eau de 1/9) pendant 30 min à température ambiante de 25°C (Figure 16a). Une agitation manuelle est effectuée régulièrement. Le mélange est filtré à l'aide d'une poche de filtration (10 x 38 cm, diamètre de mailles 25 µm, Leentech, Belgique) afin d'obtenir l'extrait d'*Hibiscus* (Figure 16b).



Figure 16 : macération (a) et filtration (b) de l'extrait d'hibiscus

2.1.2 Préparation de la fraction polyphénolique

L'extrait d'hibiscus est ensuite fractionné sur une colonne de résine Amberlite XAD-16 20 (hauteur 22 cm ; diamètre 2,5 cm ; volume de résine solvatée VR) préalablement conditionnée avec 4 VR de méthanol/eau (80/20 v/v), 4 VR de méthanol/eau (20/80 v/v) et 4 VR d'eau milli-Q. Après dépôt de l'extrait sur la résine, la colonne est lavée avec 4 VR d'eau milli-Q puis éluée avec 4 VR de méthanol/eau (80/20 v/v) et 4 VR de méthanol pur à un débit de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Les fractions éluées sont rassemblées, évaporées à sec sous vide puis redissoutes dans un volume d'eau milli-Q équivalent au volume d'extrait passé sur la résine. L'extrait obtenu constitue la fraction polyphénolique (FP). Le pH de cette fraction est ajusté au pH de l'extrait avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré.

2.1.3 Préparation des solutions modèles

Les solutions ont été préparées par solubilisation des standards commerciaux dans une solution d'acide malique, acide majoritaire de l'hibiscus, à une concentration de 0,1 M (pH 2,2). La composition de chaque solution modèle est présentée dans les tableaux 12 et 13. Ces solutions sont ensuite stockées à $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tableau 12 : composition des solutions modèles à base d'anthocyanes

Composition des solutions modèles	Avec cyanidine													Avec delphinidine					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Delphinidine 3-O-sambubioside (200 mg.L ⁻¹)				X										X	X	X	X	X	X
Cyanidine 3-O-sambubioside (200 mg.L ⁻¹)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X				
Acide 3- caféoyl quinique (200 mg.L ⁻¹)	X		X	X	X	X	X		X	X				X	X	X	X		
Acide gallique (200 mg.L ⁻¹)																			X
Phloroglucinaldéhyde (200 mg.L ⁻¹)								X											
Fe III* (1 mg.L ⁻¹)	X	X	X		X									X			X		
Fe III* (7 mg.L ⁻¹)						X													
Fe III* (13 mg.L ⁻¹)				X			X	X				X			X	X		X	X
Mn II [»] (20 mg.L ⁻¹)	X	X							X		X			X					
Cu II ^{<} (0,3 mg.L ⁻¹)	X	X	X											X					

Métaux utilisés sous forme : * FeCl₃; [»] MnCl₂; [<] CuCl₂

Tableau 13 : composition des solutions modèles sans anthocyane

Composition des solutions modèles	A1	A2	A3	A4
Acide 3-caféoyl quinique (200 mg.L ⁻¹)				X
Acide protocatéchique (200 mg.L ⁻¹)	X	X		
Acide gallique (200 mg.L ⁻¹)	X		X	
Fe III (13 mg.L ⁻¹)	X	X	X	X

2.2 Traitement thermique et stockage

Les extraits (dégazés ou non) et la FP sont stockés dans des flacons ambrés, hermétiquement fermés puis soumis à un traitement thermique de pasteurisation dans un bain d'huile (barème : 2 min/85°C) muni d'un système de contrôle de température (AM 3001 K, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Les flacons sont rapidement refroidis dans un bain de glace puis conservés à 4, 20, 30 et 37°C pour l'extrait et à 37°C pour la FP et les solutions modèles pendant 60 j. Avant analyse par CLHP, les échantillons sont filtrés (Millipore, 0,45 µm), sauf les solutions modèles.

Le dégazage de l'extrait est effectué par barbotage de diazote jusqu'à ce que la teneur en oxygène dissous soit inférieure à 0,5 mg.L⁻¹. La teneur en oxygène dissous est mesurée par un oxymètre Multi 350i (WTW, Allemagne).

2.3 Analyses physico-chimiques

Le pH des extraits et de la FP est mesuré à 25 °C avec un pH-mètre Inolab 7110 (WTW, Allemagne). La mesure de l'extrait sec soluble (ou degré Brix) est effectuée à température ambiante avec un réfractomètre électronique ATAGO (Pal3 Pocket, Japon) sans compensation de température.

2.3.1 Analyse des acides organiques

Les acides organiques ont été analysés par CLHP sur un système AGILENT 1100 (Massy, France) composé de pompes quaternaires, d'un détecteur à barrette de diodes et d'un injecteur automatique. La colonne utilisée est une colonne HyperRez XP carboH⁺ (250 mm, 8 µm, Thermoscientific, Fischer, France).

L'élution est réalisée en mode isocratique à un débit de 0,8 mL.min⁻¹ avec de l'acide sulfurique 0,05 M. La détection est effectuée à 210 et 245 nm. Le volume d'injection

est de 20 μL . Les identifications ont été réalisées par comparaison avec des standards commerciaux.

2.3.2 Analyse des sucres

Les sucres sont analysés sur une chaîne CLHP (système Agilent 1290 Infinity II) équipée d'une pompe quaternaire G7104A, d'un échantillonneur, d'un détecteur refractométrique, d'un injecteur automatique G7116B et pilotée par le logiciel Openlab (Agilent technologie, Santa-Clara, CA, USA). La séparation est effectuée en utilisant une colonne Shodex SUGAR SH1011, 300 \times 8 mm, 5 μm (Showa Denko, Munich, Germany) maintenue à une température de 50 $^{\circ}\text{C}$. La phase mobile est constituée de H_2SO_4 0,01N. Le volume d'injection est de 20 μl et le débit de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.3.3 Analyse des minéraux

2.3.3.1 Minéralisation par voie sèche et mise en solution

Environ 500 mg de matériel végétal préalablement séché sont introduits dans une capsule en platine. La capsule est placée dans un four dont la température est progressivement augmentée jusqu'à 500 $^{\circ}\text{C}$ puis maintenue ainsi pendant 2 h. Un pallier est effectué aux alentours de 200 $^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la fin du dégagement de fumées. Après refroidissement, les cendres sont humectées avec quelques gouttes d'eau puis 4 mL de HCl 6 N sont ajoutés. L'ensemble est laissé en contact 10 min puis filtré dans une fiole jaugée de 50 mL. Le filtre contenant le résidu est alors calciné à 500 $^{\circ}\text{C}$. Un à 2 ml d'acide fluorhydrique sont alors ajoutés sur les cendres puis évaporés sur plaque chauffante. La silice contenue dans les cendres est ainsi volatilisée sous forme de SiF_6 . Le résidu est repris par 1 mL de HCl 6 N puis filtré dans la même fiole de 50 mL. Après avoir ajusté avec de l'eau au trait de jauge, la solution est homogénéisée par agitation.

2.3.3.2 Dosage

La solution est analysée par un spectromètre d'émission plasma à couplage inductif ICP VARIAN VISTA (Victoria, Australie), équipé d'un détecteur CCD (Coupled Charged Device) permettant la détermination simultanée, à plusieurs longueurs d'onde, de tous les éléments de la classification périodique des éléments à l'exception des corps gazeux. Les dosages sont effectués en réalisant un étalonnage respectant les conditions du milieu analysé (matrice, acidité).

2.3.4 Analyses des polyphénols

2.3.4.1 Identification par CLHP-SM

L'analyse par CLHP/SM est réalisée sur une chaîne CLHP SURVEYOR, équipée d'un détecteur à barrette de diodes modèle UV6000LP, de pompes quaternaires P4000, d'un injecteur automatique AS3000 et couplée à un spectromètre de masse LCQ équipé d'une source d'ionisation électro-spray (THERMO FINNIGAN, San José, USA). La séparation est effectuée à l'aide d'une colonne ACE C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m, AIT, France) thermostatée à 30 °C. La phase mobile est constituée des solvants A eau/acide formique/acétonitrile (99,1/0,1/0,8 v/v/v) et B acétonitrile. Les conditions d'élution sont décrites dans le Tableau 14. Le volume d'injection est de 20 μ L.

Tableau 14 : gradient d'élution utilisé pour l'analyse CLHP-SM des polyphénols

Temps (min)	Débit (mL.min ⁻¹)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	0,7	95	5
50	0,7	75	25
52	0,7	0	100
60	0,7	0	100
62	0,7	95	5
78	0,7	95	5

La détection est effectuée à 280, 330, 360 et 520 nm. L'électro-nébulisation est réalisée en mode négatif. La plage de masses est comprise entre 100 et 2000 Da. La température de désolvatation est de 300 °C. La tension du spray est de 5000 V. Les fragmentations de type MSⁿ sont réalisées avec des énergies de collision comprises entre 30 et 50%.

2.3.4.2 Quantification par CLHP-DAD

La quantification est réalisée par CLHP à l'aide d'une chaîne CLHP DIONEX Ultimate 3000 équipée d'un détecteur à barrette de diodes, de pompes quaternaires et d'un injecteur automatique. Les conditions chromatographiques utilisées sont les mêmes que celles décrites pour l'identification sauf la proportion des constituants de la phase mobile A : eau/acide formique/acétonitrile (97,2/2/0,8 v/v/v).

La quantification est effectuée par étalonnage externe à 520 nm pour les anthocyanes, à 280 nm pour les acides gallique et protocatéchique, à 330 nm pour l'acide chlorogénique (caféoyl 3 quinique) et à 360 nm pour les flavonols. Les analyses sont réalisées en triplicata.

2.3.5 Suivi spectrophotométrique UV-visible dans les modèles d'études

Les mesures spectrophotométriques ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre SPECORD S600 Analytic Jena (Jena, Allemagne) couplé à un cryostat F250 (Julabo, Allemagne). Les échantillons sont dilués dans une solution d'acide malique (pH 2,15) au 1/20^{ème} pour les solutions modèles et au 1/90^{ème} pour l'extrait et la FP. Les mesures sont réalisées dans des cuves en quartz thermostatées à 25 °C. Pour chaque échantillon le spectre UV-visible est enregistré entre 190 et 800 nm. L'indice de brun est déterminé dans les échantillons par spectrophotométrie selon l'équation 2.

$$IB = \frac{A_{420}}{A_{520}} \quad (2)$$

où A est l'absorbance obtenue à une longueur d'onde spécifique.

2.3.6 Chromatographie d'exclusion

Les extraits sont fractionnés sur le principe d'exclusion. La séparation est réalisée périodiquement sur des extraits conservés à 37 °C à l'aide d'une colonne de gel Sephadex G-25 (hauteur 22 cm ; diamètre 2,5 cm, Pharmacia, Upsala, Suède) préalablement conditionnée avec un mélange éthanol/eau (60/40 v/v) saturé avec de l'urée 8 M (pour augmenter la force ionique et perturber les éventuelles interactions des composés de l'extrait avec la phase stationnaire) et acidifié avec de l'HCl concentré (pH final 2,2). Deux mL d'extrait sont déposés sur le gel et l'élution est réalisée en mode isocratique avec le solvant de conditionnement à un débit de 0,8 mL.min⁻¹. Des fractions de 10 mL sont recueillies à la sortie du gel et conservées à -20 °C avant analyses. Les fractions obtenues par gel d'exclusion sont diluées 2 fois dans le solvant d'élution avant l'analyse spectrophotométrique.

2.3.7 Mesure du pourcentage de couleur polymérique

Des volumes de 2,8 mL des échantillons (extrait, FP et fractions obtenues par gel d'exclusion) dilués comme indiqué ci-dessus sont additionnés respectivement à 0,2 mL d'eau milli-Q pour la mesure de la densité de couleur et à 0,2 mL de

métabisulfite de potassium (1 M) pour la mesure de la couleur polymérique. Les absorbances sont mesurées sur un spectrophotomètre SPECORD S600 (cf. paragraphe 2.3.5). Le pourcentage de couleur polymérique est déterminé par les équations (3,4 et 5).

$$\text{Densité de couleur} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] * \text{facteur de dilution} \quad (3)$$

$$\text{Couleur polymérique} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] * \text{facteur de dilution} \quad (4)$$

% Couleur polymérique

$$= \frac{\text{Couleur polymérique}}{\text{Densité de couleur}} * 100 \quad (5)$$

2.4 Modélisation de la dégradation des anthocyanes

La cinétique de dégradation des anthocyanes suit une loi de premier ordre. Ainsi, la vitesse de dégradation des anthocyanes est proportionnelle à leur concentration (équation 6). Après intégration, l'équation 7 est obtenue.

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k * [A] \quad (6)$$

$$[A] = [A]_0 e^{-kt} \quad (7)$$

avec :

- A_0 = concentration initiale en anthocyanes
- $[A]$ = concentration en anthocyanes au cours du temps
- t = temps (s)
- k = constante de vitesse (s^{-1})

En considérant i différentes voies parallèles de réaction toutes d'ordre 1 avec une vitesse de réaction k_i , les concentrations des différents produits de dégradation P_i augmentent au cours du temps selon l'équation 8.

$$P_i = A_0 \frac{k_i}{k} (1 - e^{-kt}) \quad (8)$$

avec $k = \sum k_i$

on suppose une concentration initiale $P_0=0$ à $t=0$.

Pour décrire la dépendance à la température de la vitesse de dégradation des anthocyanes, le modèle d'Arrhenius est choisi (équation 9).

$$k = k_{\infty} e^{-\left(\frac{E_a}{RT}\right)} \quad (9)$$

avec

- k = constante de vitesse
- k_{∞} = facteur pré-exponentielle (s^{-1})
- E_a = énergie d'activation ($J.mol^{-1}$)
- R = constante des gaz parfaits ($8,32 J.mol^{-1}.K^{-1}$)
- T = température (K)

Cette formule peut également s'écrire selon l'équation 10, en choisissant une température de référence dans l'intervalle de température étudié.

$$k = k_{ref} e^{-\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right)} \quad (10)$$

- T_{ref} = température de référence (choisie ici à 293,13 K).

L'identification des constantes cinétiques a été réalisée via le solveur d'Excel. Les constantes de vitesse et énergies d'activation sont obtenues par régression non linéaire par minimisation des moindres carrés. L'incertitude sur les constantes de vitesse est obtenue en utilisant la macrofonction « SolverAid » proposée par de Levie (2012).

Pour le calcul de la température optimale de stockage, les équations 7 et 10 ont été combinées pour obtenir l'équation 11.

$$T = \frac{T_{ref} E_a}{E_a - R T_{ref} \ln \left(-\frac{1}{t k_{ref}} \ln \frac{A}{A_0} \right)} \quad (11)$$

2.5 Étude de la fraction polymérique

2.5.1 Fractionnement de l'extrait

Cent millilitres d'extrait d'hibiscus conservé 71 j à 37 °C sont évaporés à sec, repris dans 20 mL d'eau Milli-Q puis déposés sur une colonne de gel G-25 (hauteur 43 cm ; diamètre 4 cm) conditionnée comme décrit dans le paragraphe 2.3.6).

L'élution est réalisée à un débit de 2 mL.min⁻¹. Trois fractions « brunes » de 40 mL de volume chacune sont collectées. Ces fractions sont évaporées à sec, reprises dans 5 mL d'eau milli-Q puis déposées sur une colonne de Rélite SP 411 (hauteur 18 cm ; diamètre 2,5 cm ; volume (VR) 90 mL). La colonne est lavée avec 4 VR d'eau puis successivement éluée avec 2 VR de méthanol et 2 VR d'acétone/eau (60/40 v/v). Chaque fraction éluée est concentrée puis ajustée avec de l'eau à un volume de 10 mL.

2.5.1.1 CLHP préparative

Les solutions ci-dessus obtenues sont fractionnées sur une chaîne CLHP Knauer (Allemagne) équipée d'un collecteur de fractions. La séparation est effectuée le long d'une colonne Eurospher 100-10 C 18 (250 x 20 mm). Les solvants utilisés sont de l'eau acidifiée avec 1% d'acide formique (A) et B est du méthanol pur. Le gradient se compose comme suit : de 5 à 50% de B en 30 min puis de 50 à 100% de B en 5 min à un débit de 10 mL.min⁻¹. La détection est effectuée à 280 nm et le volume d'injection est de 5 mL. Pour chaque analyse 3 fractions sont collectées (environ 60 mL chacune).

Après concentration, chaque fraction est analysée par CLHP dans les conditions décrites au paragraphe 2.3.4.2. Ensuite les échantillons sont lyophilisés pendant 48 h (USIFROID SMH 15, France) avec une température de plateau de 25 °C et une surgélation préalable des échantillons à -45 °C pendant 30 min.

2.5.1.2 Analyse par résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN ont été collectés sur un spectromètre Bruker Avance III 500 MHz équipé d'une cryosonde 5 mm Observation large bande CP-BBO. Le spectre 2D g-HSQC 13C-1H a été enregistré en utilisant un pulse gradient et une matrice de 256 points réels (t1) et 2048 points complexes (t2), 32 scans par incréments t1 avec un délai de relaxation de 1,5 s et une fenêtre spectrale de 5000 Hz en 1H et 20800 en 13C ont été utilisés. Les spectres ont été traités et visualisés avec le logiciel Topspin 3.2 (Bruker Biospin) sur une station Linux.

2.5.1.3 Hydrolyse acide de la fraction 1 (purifiée par CLHP préparative)

Dix milligrammes de fraction F1 purifiée sont dissous dans 4 mL d'un mélange méthanol/eau (50/50 : v/v) acidifié (HCl, 2M) puis chauffés durant 2 h à 90 °C. La

solution est ensuite analysée par CLHP dans les conditions décrites au paragraphe 2.3.4.2.

2.6 Détermination des constantes d'équilibre d'acidité et d'hydratation

2.6.1 Préparation des solutions

Des standards de cyanidine 3-O-sambubioside et delphinidine 3-O-sambubioside ont été dissous séparément dans une solution d'acide malique (0,1 M - pH 2,2) pour obtenir des solutions de concentration $1,2 \cdot 10^{-4}$ M.

Douze solutions d'hydroxyde de sodium de concentrations comprises entre 10^{-2} et $1,2 \cdot 10^{-1}$ M ont été utilisées. Toutes les solutions ont été équilibrées à la température des essais (4, 15, 25, 30 et 37 °C) durant 1 h avant utilisation.

2.6.2 Méthode du saut de pH (pH-jump)

La méthode utilisée est adaptée de celle décrite par Dangles *et al.* (1993b). Une cuve en quartz ($d = 1$ cm) contenant 1 mL de solution d'anthocyane est placée sous agitation magnétique dans un spectrophotomètre (SPECORD S600 Analytik Jena, Allemagne) équipé d'un cryostat F250 (Julabo, Allemagne). Un mL de NaOH est ajouté rapidement dans la cuve et les spectres (200-800 nm) sont enregistrés immédiatement à raison d'une mesure par seconde durant les 10 premières secondes puis une mesure toutes les 5 secondes jusqu'à atteindre l'équilibre d'hydratation. Le pH final est soigneusement mesuré. Il est compris entre 2,5 et 4,5. Pour chaque essai, au moins 10 concentrations de solution de soude sont utilisées et la durée de mesure (atteinte de l'équilibre) est comprise entre 1 min et 1 min 30 s selon la température à laquelle est effectuée l'expérimentation. A la fin de chaque essai, la solution la moins basique est acidifiée avec de l'HCl concentré sans dilution significative (20 μ L) pour obtenir un pH inférieur à 1 et le spectre est enregistré. Tous les essais ont été réalisés trois fois.

Cette analyse a également été effectuée à 25 °C sur de l'extrait d'hibiscus préalablement dilué 10 fois dans de l'acide malique 0,1 M (pH 2,2).

2.6.3 Identification de K_a et K'_h avec la méthode de Brouillard

Pour la détermination des constantes d'équilibre, les absorbances ont été enregistrées à des longueurs d'onde proches du maximum d'absorption soit 515 nm pour Cya-3Sb, 520 nm pour Del-3Sb et 522 nm pour l'extrait d'hibiscus. Les données

spectrophotométriques sont utilisées pour identifier la constante de vitesse d'hydratation apparente du premier ordre (k_h^{obs}) (équation 12 linéarisée dans l'équation 13).

$$A = A_{eq} + (A_0 - A_{eq})exp(-k_h^{obs}t) \quad (12)$$

$$\ln \frac{A - A_{eq}}{A_0 - A_{eq}} = -k_h^{obs}t \quad (13)$$

où A_{eq} est l'absorbance à l'équilibre, A_0 l'absorbance initiale juste après saut du pH et A l'absorbance mesurée au cours du temps t . Au moins 10 triplets (pH , k_h^{obs} , A_{eq}) ont été obtenus.

Les constantes globale d'acidité et d'hydratation (K_a , K'_h) ont été estimées comme suit. Tout d'abord, la relation linéaire entre $A_f / (A_f - A_{eq})$ et 10^{-pH} est appliquée (équation 14).

$$\frac{A_f}{A_f - A_{eq}} = \frac{K'_h + K_a}{K'_h + K_a(1 - r_A)} + \frac{10^{-pH}}{K'_h + K_a(1 - r_A)} \quad (14)$$

où A_f est l'absorbance de la solution fortement acide ($pH < 1$) de l'anthocyane (100% sous forme flavylum) et r_A , le rapport des coefficients d'absorption molaires, $\epsilon_A / \epsilon_{AH^+}$.

La somme $K'_h + K_a$ a donc été calculée à partir du rapport ordonnée à l'origine/pente. Enfin, le rapport $(K_a + K'_h + 10^{pH}) / k_h^{obs}$ vs. 10^{pH} a permis la différenciation des constantes d'hydratation et d'acidité (équation 15).

$$\frac{K_a + K'_h + 10^{-pH}}{k_h^{obs}} = \frac{1 + K_t}{k_{-h}} + \frac{K_a(1 + K_t)}{k_{-h}} 10^{pH} \quad (15)$$

où k_{-h} représente la constante de vitesse du processus de déshydratation.

Le rapport ordonnée à l'origine / pente donne accès à K_a . K'_h peut être estimée à partir de la somme $K + K'_h$ déterminée précédemment.

La constante de vitesse apparente d'hydratation de l'ion flavylum peut être exprimée selon l'équation 16 comme le propose Pina (2014):

$$k_h^{obs} = \chi_{AH^+} k_h + \chi_B k_{-h} [H^+] \quad (16)$$

La fraction molaire de AH^+ (χ_{AH^+}) en équilibre acido-basique rapide avec A est déterminée selon l'équation 17.

$$\chi_{AH^+} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} \quad (17)$$

La fraction molaire de B (χ_B) dans l'équilibre de tautomérisation avec C_c est déterminée par l'équation 18.

$$\chi_B = \frac{1}{1 + K_t} \quad (18)$$

En remplaçant l'expression des fractions molaires dans l'équation (16) et en utilisant

$K_h = \frac{k_h}{k_{-h}}$, on obtient l'expression 19.

$$\frac{[H^+] + K_a + K_h(1 + K_t)}{k_h^{obs}} = \frac{1 + K_t}{k_{-h}} + \frac{K_a(1 + K_t)}{k_{-h}} \frac{1}{[H^+]} \quad (19)$$

Il faut noter qu'un suivi spectral sur quelques min après le saut du pH ne suffit pas pour assurer la conversion totale de C_c en C_t . Par conséquent, la valeur K_h ainsi déterminée est en fait définie comme suit : $K'_h = (H^+)[(B) + (C_c)]/(AH^+) = K_h(1 + K_t)$. Cependant, la mesure spectrale à l'équilibre ($t \approx 1h$) n'a donné des valeurs A_{eq} que très légèrement inférieures, ce qui signifie que C_t est une espèce mineure pour les anthocyanes ($K_i \ll 1$).

En supposant que C_t est une espèce mineure ($K_i \ll 1$), $K_h(1 + K_t)$ peut être identifiée avec K'_h et l'équation (19) est ainsi équivalente à l'équation (15) utilisée pour la détermination de pKa.

2.6.4 Identification de K_a et K'_h par la Résolution Multivariée de Courbes par Moindres Carrés Alternés (MCR-LAS)

La MCR-ALS est une méthode d'analyse des mélanges de constituants à partir du spectre global de la solution. Pour cela, elle consiste à réaliser une décomposition bilinéaire d'une matrice expérimentale de mesures spectrophotométriques d'un mélange, notée matrice expérimentale D (m, n), en deux matrices : la matrice des concentrations des composés purs C (m, k) et la matrice des spectres purs S^T (k, n). La relation mathématique à la base de la décomposition des valeurs expérimentales

est la forme matricielle de la loi de Beer-Lambert généralisée à toutes les longueurs d'ondes. Cette loi repose sur la relation entre l'absorbance d'une solution et sa concentration et sur l'additivité des absorbances (équation 20) :

$$D(m, n) = C(m, k) S^T(k, n) + E(m, n) \quad (20)$$

Où k, c'est le nombre d'espèces inconnues du mélange et E (m, n), la matrice de l'erreur résiduelle.

La résolution de l'équation (20) est réalisée par un processus itératif qui s'arrête lorsque l'erreur (E) est minimale. Cette procédure peut générer beaucoup de solutions et certaines d'entre elles sont chimiquement impossibles. Par conséquent, la qualité des données dans le processus d'optimisation est améliorée par l'ajout de contraintes d'optimisation ayant un sens physique ou chimique (bilan matière, non négativité...) (Ruckebusch et Blanchet, 2013). La MCR-ALS a été réalisée grâce à l'exécutable développé par Jaumot *et al.*, (2005) sous Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA). La contrainte de non-négativité des concentrations et des spectres a été appliquée grâce à l'algorithme FNNLS (fast non-negative least squares). La procédure MCR a été appliquée pour deux jeux de données expérimentales :

- les données spectrales dans le cadre des expérimentations de saut de pH pour l'identification des constantes d'équilibres des anthocyanes (cf. publication 1). Pour cela, la MCR-ALS a été appliquée sur toutes les données spectrophotométriques obtenues aux 10 sauts de pH différents (l'acquisition de données communes avec l'exploitation de Brouillard). Pour chaque essai, le spectre global (de 240 à 800 nm, chaque 0,5 nm) a été enregistré sur 21 points sur une durée de 1 à 1,5 min. Par conséquent, pour chaque valeur de pH final, une matrice [1120, 21] a été obtenue. Les 10 matrices ont été ensuite superposées les unes aux autres pour former une matrice totale [11200, 21] sur laquelle MCR-ALS a été appliquée. La qualité du modèle final est évaluée par les paramètres suivants (équation 21 et 22).

$$\text{Défaut d'ajustement} = 100 \times \sqrt{\frac{\sum(\text{résidus})^2}{\sum(\text{matrice initiale})^2}} \quad (21)$$

$$\text{Variance expliquée (R}^2\text{)} = \frac{\sum(\text{matrice initiale})^2 - \sum(\text{résidus})^2}{\sum(\text{matrice initiale})^2} \quad (22)$$

- Les données spectrales obtenues au cours du stockage de l'extrait d'hibiscus pour l'identification de produits de dégradation. Pour cela, la même procédure que précédemment a été employée sur la matrice de 10 spectres obtenus pendant 1 mois de stockage de l'extrait à 37°C. La MCR-ALS a également été réalisée sur les spectres des fractions à haut poids moléculaire et à bas poids moléculaires obtenues après séparation sur gel d'exclusion (cf. paragraphe 2.3.6). Pour améliorer la qualité de la résolution, les matrices expérimentales ont été additionnées des spectres de composés purs identifiés dans l'extrait.

2.6.5 Paramètres thermodynamiques

Pour le transfert de protons et des équilibres d'hydratation, les changements d'enthalpie et d'entropie standards (ΔH^0 et ΔS^0 , supposées être indépendantes de la température dans la gamme étudiée) ont été estimées à partir de l'équation de Van't Hoff (équation 23).

$$\ln K = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT} \quad (23)$$

En effet, la représentation $\ln K$ vs. $1/T$ ont été linéaire, la pente et l'ordonnée à l'origine correspondante donnant accès à ΔH^0 et ΔS^0 , respectivement.

2.7 Analyses statistiques

Pour chaque cinétique au moins 3 constantes de vitesse sont obtenues grâce à des répétitions expérimentales. Des analyses ANOVA ($p < 0,05$) sont réalisées sur les valeurs des constantes cinétiques issues des différents milieux en utilisant XLSTAT® 2012. Les groupes homogènes ont été déterminés par un test de Tukey ($p < 0,05$) et sont identifiés dans les tableaux par des lettres minuscules représentées en exposant.

CHAPITRE III

Résultats

- 1^{ère} partie** : Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products
- 2^{ème} partie** : Effect of temperature on acidity and hydration equilibrium constants of delphinidin 3-O- and cyanidin 3-Osambubioside calculated from uni- and multi-wavelength spectroscopic data
- 3^{ème} partie** : Exploration of reaction mechanisms of anthocyanin degradation in a roselle extract through kinetic studies on formulated model media

1^{ère} partie: Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products

André Sinela^a, Nadirah Rawat^b, Christian Mertz^{b*}, Nawel Achir^c, Hélène Fulcrand^d
and Manuel Dornier^c

^aInstituto Superior de Tecnologia Agro-alimentar de Malanje (ISTAM), EN 230 km 2, Malanje, Angola.

^bCentre International de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR95 Qualisud, TA B-95/16, 73 rue J.F. Breton F-34398, Montpellier Cedex 5, France.

^cMontpellier SupAgro, UMR95 QualiSud, F-34093 Montpellier, France.

^d Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR1083 SPO, F-34060 Montpellier, France.

*Corresponding author: <christian.mertz@cirad.fr>, Phone +33/467617581

Publication 1 : *Food Chemistry* (2017), 214, 234-241.

La première partie de ce chapitre décrit, sous forme d'un article publié dans *Food chemistry*, les travaux réalisés pour déterminer les paramètres cinétiques de dégradation de la delphinidine 3-O-sambubioside et de la cyanidine 3-O-sambubioside pendant le stockage des extraits d'hibiscus à différentes températures (4-37 °C). Les modifications de la couleur et de la composition de l'extrait sont étudiées d'un point de vue cinétique et mécanistique, ce qui sera utile pour limiter la dégradation de la qualité de l'extrait pendant le stockage.

Les anthocyanes et leurs produits de dégradation sont suivis et quantifiés par CLHP-SM et CLHP-DAD. La dégradation des anthocyanes suit une cinétique d'ordre 1. La constante de vitesse obtenue à 37 °C est plus élevée pour la delphinidine 3-O-sambubioside que pour la cyanidine 3-O-sambubioside (respectivement $9,2 \cdot 10^{-7}$ et $8,4 \cdot 10^{-7} \text{s}^{-1}$). La vitesse de dégradation des anthocyanes suit une loi d'Arrhénius en fonction de la température. La dégradation de la delphinidine 3-O-sambubioside ($E_a = 90 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) est plus sensible à l'élévation de la température que celle de la cyanidine 3-O-sambubioside ($E_a = 80 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$). La dégradation de ces deux anthocyanes conduit à la formation de produits de scission tels que les acides gallique et protocatéchique. Elle s'accompagne d'une augmentation de l'indice de couleur polymérique.

Abstract

Degradation parameters of two main anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.) stored at different temperatures (4-37°C) over 60 days were determined. Anthocyanins and some of their degradation products were monitored and quantified using HPLC-MS and DAD. Degradation of anthocyanins followed first-order kinetics and reaction rate constants (k values), which were obtained by non-linear regression, showed that the degradation rate of delphinidin 3-O-sambubioside was higher than that of cyanidin 3-O-sambubioside with k values of $9.2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ and $8.4 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ at 37°C respectively. The temperature dependence of the rate of anthocyanin degradation was modeled by the Arrhenius equation. Degradation of delphinidin 3-O-sambubioside ($E_a = 90 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) tended to be significantly more sensitive to an increase in temperature than cyaniding 3-O-sambubioside ($E_a = 80 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$). Degradation of these anthocyanins formed scission products (gallic and protocatechuic acids respectively) and was accompanied by an increase in polymeric color index.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*; delphinidin 3-O-sambubioside; cyanidin 3-O-sambubioside; thermal degradation; kinetics.

1. Introduction

Anthocyanins represent the largest group of water soluble pigments in plants. They are highly appreciated in the food industry for their coloring properties, which can give food various hues of red and violet. Many edible plants are sources of anthocyanins, these include roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*) (Cisse, Dornier, Sakho, Ndiaye, Reynes & Sock, 2009; Du and Francis, 1973; Wong, Yusof, Ghazali & Che Man, 2002).

Hibiscus sabdariffa is an herbaceous plant, cultivated largely in tropical and subtropical areas of both hemispheres. Its calyces (consumed in large quantities in Africa and Asia as a beverage following maceration in water) contain high amounts of anthocyanins, especially delphinidin 3-O-sambubioside and cyanidin 3-O-sambubioside, up to 2.5 g.100 g⁻¹ DM (Wong *et al.*, 2002; Juliani, Welch, Wu, Diouf, Malainy & Simon, 2009; Du *et al.*, 1973).

Recently, research carried out on anthocyanins has drawn much attention as they do not only impart beautiful coloration to food products but also have antioxidant properties and health benefits such as enhancement of sight acuteness, antioxidant capacity, controlling Type II diabetes, reduction of coronary heart disease and prevention of cancer (Peleg, Kim & Normand, 2015; Thilakarathna and Rupasinghe, 2013).

Heat processing (e.g., pasteurisation and sterilisation) is an extremely common and effective method of preserving beverages but may result in quality loss (Kirca and Cemeroglu, 2003). Indeed, elevated temperatures can affect anthocyanin stability and cause monomeric anthocyanins to polymerize, resulting in browning, which is undesirable in products such as fruit juices because consumers perceive it as an indication of inferior quality (Kirca *et al.*, 2003; Somers, 1968). A lot of studies have reported that degradation of anthocyanins, at relevant temperatures (up to 100°C) in food processing or during storage follows first-order kinetics (Ahmed, Shivhare & Raghavan, 2004; Cemeroglu, Velioglu & Isik, 1994; Kirca *et al.*, 2003; Patras, Brunton, O'Donnell & Tiwarib, 2010).

The aim of this study is to independently determine the kinetic parameters for delphinidin 3-O-sambubioside and cyanidin 3-O-sambubioside during calyces extract

storage at various temperatures as well as analyzing changes in color and extract composition from a kinetic and mechanistic point of view. This will be helpful to limit anthocyanins degradation in Hibiscus extract during storage.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

Calyces of Hibiscus *sabdariffa* used in the experiments described hereafter belonged to the variety Vimto, cultivated in the village of Thiaré, Senegal. Upon harvesting, the calyces were manually shelled and sun-dried on racks for 5 to 10 days.

2.2 Reagents

All solvents were of HPLC grade and purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Deionized water was produced by a Milli-Q unit (Millipore, Bedford, MA, USA). The polyphenols were quantified using standards (delphinidin 3-O-sambubioside, cyanidin 3-O-sambubioside, 3-caffeoylquinic acid, gallic, and protocatechuic acids, quercetin, and kaempferol) supplied by Extrasynthese (Genay, France).

2.3 Extract preparation, thermal treatment and storage

To prepare the roselle extract, calyces were ground with an electric grinder (VORWERK Thermomix, France) and macerated in deionized water using a calyces/water ratio of 1/10(w/w) for 30 min at ambient temperature. Manual agitation was carried out regularly. The mix was then successively filtered through a filter bag (10x38 cm, pore diameter 25 μ m, Leentech, Belgium) and placed in amber vials that were hermetically sealed, containing 15mL of extract. The pH of the extract was 2.2. The vials were submitted to a pasteurization treatment carried out by immersion in an oilbath under temperature control. A digital temperature probe (Almemo[®] ZA9020-FS thermo E4, France) fitted to a reference tube was used to measure the juice temperature during the thermal experiments. The couple temperature/time used was 84°C/2 min leading to a target pasteurization value of 50 min calculated at a reference temperature of 70°C with $z=10^\circ\text{C}$.

After thermal treatment, the amber vials were stored under controlled temperatures of 4, 20, 30 and 37°C for 60 days.

2.4 Identification and quantification of polyphenol compounds

For polyphenol identification, 1 g of calyx powder of *Hibiscus sabdariffa* was added to 30 mL of a solution of acetone/water/formic acid (70/28/2 v/v/v). The mixture was agitated for 10 min and then filtered through a paper filter. The filtrate was evaporated to dryness under vacuum and dissolved in 20 mL of a methanol/water mixture (50/50v/v). The solution was filtered (Millipore, 0.45 µm) prior to analysis by HPLC-MS.

Characterization was performed on an HPLC chain SURVEYOR, equipped with a diode array detector model UV6000LP, a quaternary pump P4000, an auto sampler AS3000 and coupled to a mass spectrometer LCQ equipped with an electro-spray ionization source (THERMO FINNIGAN, SanJose, USA). A column ACEC18 (250mm× 4.6 mm, 5 µm, AIT, France) thermostated at 30 °C was used. The mobile phase was constituted of water/formic acid/acetonitrile (99.1/0.1/0.8 v/v/v) as solvent A and acetonitrile as solvent B. Twenty µL of solution was injected. The flow rate was 0.7 mL.min⁻¹ with a linear gradient from 5 to 25% of solvent B in 50 min and then to 100% of solvent B in 2 min. Eluted compounds were detected at 280, 330, 360 and 510nm. The electro-spray was performed in the negative mode. The mass range was between 100 and 2000Da. The desolvation temperature was 300°C. The spray tension was 5000V. The fragmentation of the type MSⁿ was performed with collision energy between 30 and 50%.

Anthocyanins, flavonols, as well as chlorogenic, gallic, and protocatechuic acids were quantified by HPLC DIONEX ULTIMATE 3000 equipped with a diode array detector. The same operating conditions as for identification were used but the solvent A was modified to 97.2/2/0.8 (v/v/v) of water/formic acid/acetonitrile. Concentrations were determined using a calibration curve of corresponding standards and the measurement was carried out in triplicate.

2.5 Kinetic modeling of anthocyanin degradation

The isothermal degradation of anthocyanins was predicted using a first order model (Equation 1).

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt} \quad (1)$$

where C_0 and C are the initial concentration of anthocyanins and at time t (mol.L^{-1}), k the rate constant (s^{-1}) and t the time (s).

The kinetic constant was identified by nonlinear regression with a least square minimization procedure using the complement Excel "Solver". This procedure allows a more accurate identification of constants compared to the usual logarithm linearization (Van Boekel, 2009). Uncertainty of the rate constants was obtained by the VBE Macro "SolverAid" (de Lavie, 2012).

The activation energy and the rate constant at the temperature of reference were determined according to the reparametrized Arrhenius equation (Equation 2).

$$\frac{k}{k_{ref}} = \exp\left[\frac{-E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] \quad (2)$$

where k is the rate constant (s^{-1}), k_{ref} the rate constant at the reference temperature (s^{-1}), E_a the activation energy (J.mol^{-1}), R the perfect gas constant ($8.32\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T the temperature (K) and T_{ref} the reference temperature chosen as the average storage temperature (293.13K).

2.6 Spectrophotometric measurements

Brown index was determined by spectrophotometric measurements (spectrophotometer SPECORD S600, Analytik Jena, Germany) after dilution of the extract in malic acid at a pH of 2.2 (1/90 v/v). It was calculated according to equation 3.

$$BI = \frac{A_{(420nm)}}{A_{(520nm)}} \quad (3)$$

where A is the absorbance obtained at a specific wavelength.

Polymeric color index is the ratio of the polymeric color on the color density (Mazza, Fukumoto, Delaquis, Girard & Ewert, 1999). A metabisulfite solution was added to sample solutions in order to discolor the anthocyanin monomers. The residual color (called polymeric color) of the sample solutions is attributed to the presence of polymeric materials. Samples were diluted in a malic acid solution at a pH of 2.2 (1/90 v/v). 2.8 mL of diluted samples were added to 0.2 mL of milli-Q water or 0.2 mL of metabisulfite (1M) for measuring the color density and the polymeric color respectively. Polymer color index was determined by employing the equations 4 to 6.

$$\text{Polymeric color index} = \frac{\text{Polymeric color}}{\text{Color density}} \quad (4)$$

$$\text{Polymeric color} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] * \text{dilution factor} \quad (5)$$

with absorbancies measured in the sample mixed with metabisulfite

$$\text{Color density} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] * \text{dilution factor} \quad (6)$$

with absorbance measured in the sample mixed with water.

2.7 Analysis of minerals

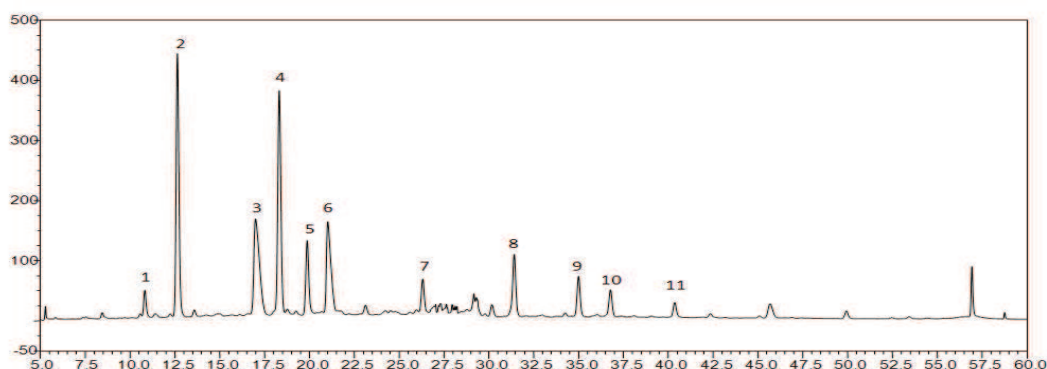
Dosage method of metals present in the extract and polyphenolic fraction was adapted from NF EN ISO 11885. Samples were analyzed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) (VARIAN VISTA, Victoria, Australia), equipped with a Coupled Charged Device detector (CCD).

3. Results and discussion

3.1 Identification and composition of polyphenols

Identification of the polyphenols in the extract was carried out on the basis of UV-visible spectra, mass molecular ions and fragment ions and compared to literature data. The UV-visible characteristics and LC-MS data obtained by HPLC-MS as well as the chromatogram at 360 nm are presented in

Table 15. Peaks were identified and labeled with numbers according to the elution order in LC-MS.

Table 15: Polyphenol identification in *Hibiscus sabdariffa* extract and HPLC chromatogram (5-60min) at 360 nm of *Hibiscus sabdariffa* extract:

Peak nr.	R _t (min)	λ _{max} (nm)	MS ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Compounds	Content (mg.mL ⁻¹)
1	10.1	287	ND	-	NI	-
2	12.6	300sh, 325	353	179 (90%), 191 (100%)	3-Caffeoylquinic acid	0.36
3	16.9	277, 524	595	355, 300	Delphinidin 3-O-sambubioside	0.78
4	18.3	300sh, 325	353	179 (10%), 191 (100%)	5-Caffeoylquinic acid	0.30
5	19.9	300sh, 325	353	173 (85%), 179 (100%), 191 (20%)	4-Caffeoylquinic acid	0.10
6	21.0	280, 516	579	339, 285	Cyanidin 3-O-sambubioside	0.46
7	26.3	259, 354	611	316	Myricetin sambubioside	-
8	31.4	255, 358	595	463, 300	Quercetin sambubioside	0.01
9	35.0	256, 354	609	301	Quercetinrutinoside	0.00
10	36.8	258, 353	463	301	Quercetin hexoside	0.00
11	40.3	266, 348	593	285	Kaempferol rutinoside	0.00

R_t: retention time; ND: undetected; NI: unidentified; sh: shoulder;

MS⁻: molecular ion mass in negative mode (-) MS²: fragment ion mass in negative mode (-)

The UV-visible spectra of peaks 2, 4 and 5 and their mass signals detected at m/z 353 in the negative mode are characteristic of caffeoylquinic acid isomers. These

compounds have been identified as 3-, 4- and 5-caffeoylquinic acids (Clifford, Knight & Kuhnert, 2003).

The UV-visible spectra and the m/z values of peaks 3 and 6, detected at 595 and 579 respectively in the negative mode, are similar to those of delphinidin 3-O-sambubioside and cyanidin 3-O-sambubioside. This was confirmed by co-injection with commercial standards. These compounds have been previously identified in roselle (Du *et al.*, 1973). The maximum spectral absorptions of peaks 7-11 display the characteristics of flavonol glycosides such as myricetin sambubioside, quercetin sambubioside and kaempferol rutinoside detected at m/z 611, 595 and 593 respectively.

Peak 1 has an absorption maximum at 287 nm and was not detected in mass spectrometry. This compound could not be identified.

The quantification of polyphenols by HPLC-MS showed the existence of two major anthocyanins namely delphinidin 3-O-sambubioside and cyanidin 3-O-sambubioside with a content of 0.78 and 0.46 mg.mL⁻¹ in the extract respectively (Table 15). This content in the dried calyces was of 0.46 and 0.30 g.100g⁻¹ respectively. Juliani *et al.*, (2009) found the total anthocyanin content of 1 to 1.5g/100g (DM) in the Vimto variety from different origins and years of production. The difference between our values and literature is probably due to extraction method (extraction solvent, time and temperature) which was not the same as well as methods of analysis used (differential pH) (Juliani *et al.*, 2009; Du *et al.*, 1973). The composition and total content of the anthocyanins in Hibiscus can also be mainly affected by cultivar, year of production, soil and climate conditions. However the proportions were in agreement with those previously reported by Mourtzinou, Makris, Yannakopoulou, Kalogeropoulos, Michali & Karathanos (2008); Milena, Ramirez, Maria, Alberto, Murat & Maurice (2011); Cisse, Vaillant, Kane, Ndiaye & Dornier (2012). These authors also found that these anthocyanins were the main ones from *Hibiscus sabdariffa*, where delphinidin 3-O-sambubioside was on average 1.7- to 2- fold superior to cyanidin 3-O-sambubioside.

3-Caffeoylquinic acid, 5-Caffeoylquinic acid, and 4-Caffeoylquinic acid are also present in significant amounts in the extract (from 0.10 to 0.36 mg.mL⁻¹) whereas flavonols are minor compounds.

3.2 Evolution pattern of anthocyanins during storage at different temperatures

The relationship between the concentration of delphinidin 3-O-sambubioside and cyanidin 3-O-sambubioside over time as a function of temperature range between 4 and 37°C is shown in Figure 17.

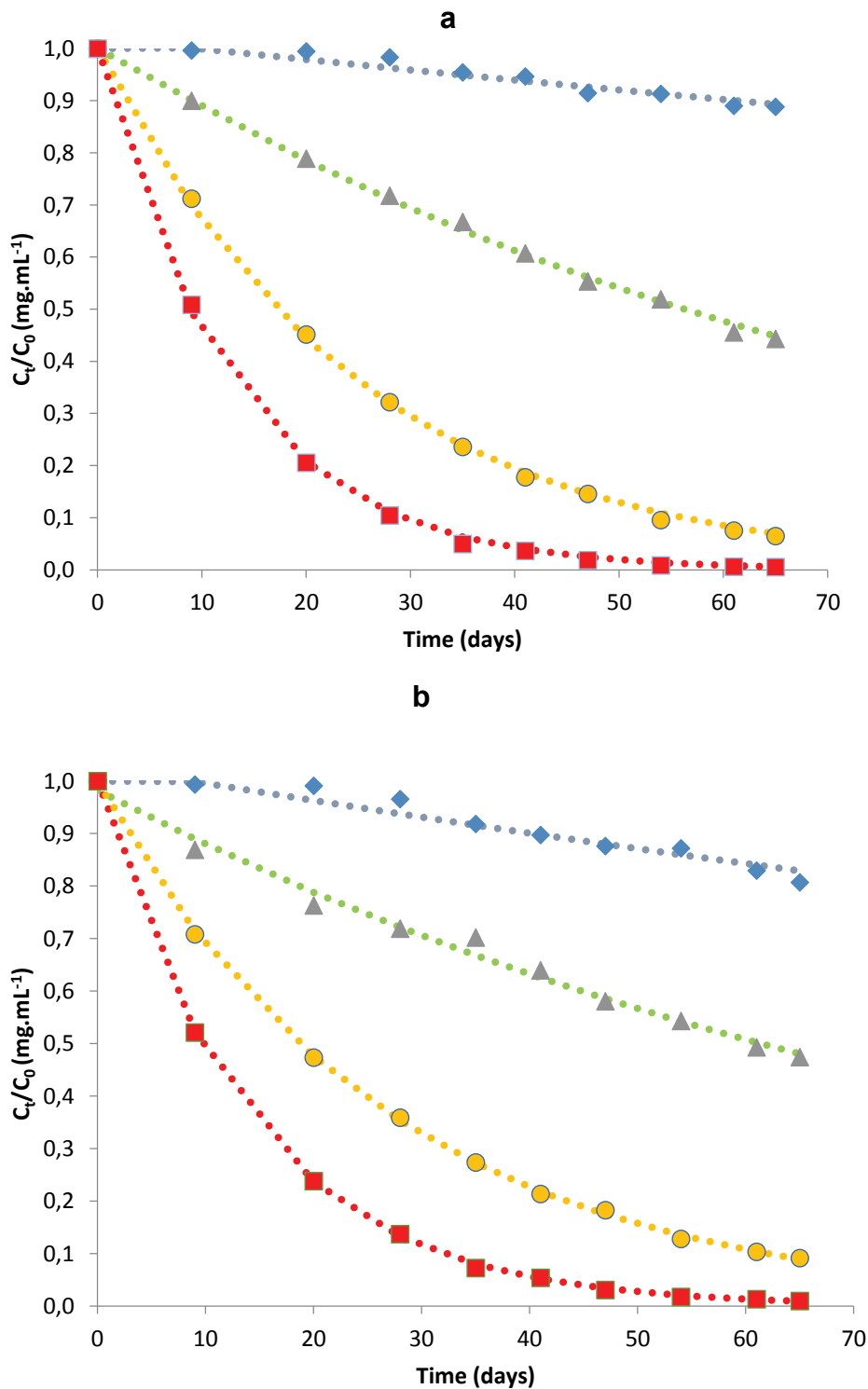


Figure 17 : Degradation kinetics of delphinidin 3-O-sambubioside (a) and cyanidin 3-O-sambubioside (b) in *Hibiscus sabdariffa* extracts during storage at different temperatures (♦ 4, ▲ 20, ● 30 and ■ 37°C). Dots are experimental data and dashed lines modeled values.

Anthocyanin concentrations decreased with time at all temperatures and more rapidly at higher temperatures, indicating the degradation of the original pigments. After 60 days, 11% of delphinidin 3-O-sambubioside was lost at 4°C and 99% at 37°C (Figure 17a). For cyanidin 3-O-sambubioside it was 17% and 98% at 4°C and 37°C respectively (Figure 17b). These results are in accordance with Alighourchi and Barzegar (2009) who found 94 and 98 % losses for delphinidin 3, 5-diglucoside and cyanidin 3, 5-diglucoside respectively at 37°C in pomegranate juice.

The linear relation between the logarithm of the concentration of these anthocyanins and time indicated a first-order kinetic for anthocyanin degradation. This is in agreement with previous studies in various matrices like aqueous extracts from roselle, grape juice and black carrot juice concentrates (Cisse *et al.*, 2012; Danisman, Arslan & Toklucu (2015); Peleg *et al.*, 2015; Türkyılmaz and Özkan 2012). The first-order reaction rate constants (k) of the model juice at each temperature are indicated in Table 16.

Table 16: Rate constants (k) and Arrhenius parameters of anthocyanin degradation in *Hibiscus sabdariffa* extracts.

Anthocyanins		
Temperature (°C)	Delphinidin3-O- sambubioside k(s⁻¹)	Cyanidin 3-O- sambubioside k(s⁻¹)
4	0.24.10 ⁻⁷ (0.025.10 ⁻⁷)	0.39.10 ⁻⁷ (0.038.10 ⁻⁷)
20	1.4.10 ⁻⁷ (0.025.10 ⁻⁷)	1.3.10 ⁻⁷ (0.048.10 ⁻⁷)
30	4.8.10 ⁻⁷ (0.064.10 ⁻⁷)	4.3.10 ⁻⁷ (0.031.10 ⁻⁷)
37	9.2.10 ⁻⁷ (0.14.10 ⁻⁷)	8.4.10 ⁻⁷ (0.053.10 ⁻⁷)
k_{20°C} (s⁻¹)	1.25.10 ⁻⁷ (0.28.10 ⁻⁷)	1.39.10 ⁻⁷ (0.13.10 ⁻⁷)
Ea (kJ.mol⁻¹)	90.0 (10.1)	80.0 (4.4)

The storage temperature had a strong influence on the degradation of anthocyanins. For example k values increased by 38-fold from 0.24.10⁻⁷s⁻¹ at 4°C to 9.2.10⁻⁷ s⁻¹ at 37°C. Except at 4°C, cyanidin 3-O-sambubioside rate constants were from 7 to 10% lower than that of delphinidin 3-O-sambubioside. Anthocyanins can undergo several structural forms in pH dependent equilibriums. In a previous paper, we established that hydration constant (hydration equilibrium) of delphinidin 3-O-sambubioside was higher than that of cyanidin 3-O-sambubioside (Vidot *et al.*, 2016). Thus, at a given

pH, the hydrated form (known to be more unstable than the flavylum cation) of delphinidin 3-O-sambubioside is more abundant than the corresponding one for cyanidin 3-O-sambubioside and suggests that the thermal degradation is related to this hydrated form.

A very low degradation rate was observed at 4°C as already stated by Kirca *et al.*, (2003), Zozio, Pallet & Dornier (2011), during refrigerated storage.

Loss of total anthocyanins was already observed during storage of roselle beverages (Cisse *et al.*, 2012; Danisman *et al.*, 2015; Peleg *et al.*, 2015; Türkyılmaz and Özkan, 2012) and *k* values increased with temperature. Cisse *et al.*, (2012) reported that the *k* values ranged from $0.578 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ at 4 °C to $1.96 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ at 45 °C which is in the order of magnitude of our values. Note that the *k* value obtained in Hibiscus extracts by these authors was the degradation rate constant for total anthocyanins present in these extracts as they were determined indiscriminately by a differential pH method. Isothermal degradation of anthocyanins was higher in Hibiscus than other food matrices. The *k* values were $1.44 \cdot 10^{-7}$; $0.891 \cdot 10^{-7}$; $0.486 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ in extracts of Hibiscus, açai and black carrot respectively at 30°C (Cisse *et al.*, 2012; Zozio *et al.*, 2011). These values are 3, 5 and 9-fold lower than ours in the same storage conditions. The differences in these *k* values (compared to ours) may be due to the structure of the sugar bound to the cyanidin (rutinoside in açai) and for black carrot to the acylation of anthocyanin. Anthocyanins with at least one glycosyl residue acylated by a phenolic acid residue are protected by the phenomenon of intramolecular co-pigmentation (Zozio *et al.*, 2011). It has been demonstrated that presence of acyl groups decrease the hydration constants of anthocyanins and thus the loss of color, due to the electron density in the acyl group (Redus *et al.*, 1999) whereas glycosidic substitution at the 5 position decreased pK_H (Stintzing *et al.*, 2002). A difference in the physico-chemical environment in which these anthocyanins are present is also a factor to consider (phenolic compounds, ions...).

Rate constants of individual anthocyanins isolated from the dry calyces of *Hibiscus sabdariffa* were evaluated in aqueous solution with storage temperatures ranging from 55 to 98°C by Gradinaru, Biliaderis, Kallithraka, Kefalas & Garcia-Viguer (2003). They found no significant difference between delphinidin 3-O-sambubioside and cyanidin 3-O-sambubioside at 55°C with *k* values of $69 \cdot 10^{-7}$ and $76 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$

respectively. These values are 10-fold higher than ours at 37°C. The rate of anthocyanin degradation has long been known to be pH dependent. Their model medium had a pH of 3.6 (2.2 in our matrix). The stability of these pigments at low pH is largely attributed to the higher concentration of the flavylum cation (Gradinaru *et al.*, 2003). The higher proportion of anthocyanins in the hydrated form at this pH value (3.6) can explain the differences observed in anthocyanins degradation rate. It also would seem that the composition of our matrix tends to stabilize the anthocyanins if compared with their model medium. Rubinskiene, Viskelis, Jasutiene, Viskeliene & Bobinas (2005) reported that cyanidin 3-glucoside had a greater stability against thermal degradation than delphinidin 3-glucoside in fresh berries of blackcurrant. During thermal processing anthocyanins can also be degraded by oxidation depending on its chemical structure. Thus, in the case of oxidation, stability increases with the number of methoxyls in the B ring and decreases as hydroxyls increase (Escribano-Bailón, Santos-Buelga & Rivas-Gonzalo, 2004).

The rate constants k_{ref} at the reference temperature (20°C) and the activation energies obtained for each anthocyanin are given in Table 16. Cyanidin 3-O-sambubioside presented lower E_a than those of delphinidin 3-O-sambubioside. This result indicated that the degradation of delphinidin 3-O-sambubioside tended to be significantly more sensitive to an increase in temperature than cyanidin 3-O-sambubioside degradation. Stored at the same temperatures, Kirca and Cemeroglu (2007) found E_a of 75 kJ.mol⁻¹ for the degradation of total anthocyanins (spectrophotometric pH-differential method) in the concentrated blackberry juice (*Rubus fruticosus* L.) while Cisse *et al.*, (2012) obtained E_a between 22 to 26 kJ.mol⁻¹ for the total anthocyanin degradation in the Thai variety of *Hibiscus sabdariffa* and 48 kJ.mol⁻¹ for the Vimto variety (Cisse *et al.*, 2009).

Gradinaru *et al.*, (2003) obtained similar E_a values (60 kJ.mol⁻¹) for both delphinidin 3-O-sambubioside and cyanidin 3-O-sambubioside in aqueous solutions (pH 3.6) using higher storage temperatures (55-98°C). This value is lower than ours; it is probably due to the difference in pH. The E_a values of black carrot anthocyanins at lower pH were significantly higher than those at higher pH (Kirca *et al.*, 2003) revealing that a lower pH can increase the sensitivity of some anthocyanins to a rise in temperature.

The ionic strength is also a factor to be considered in anthocyanin stability. In food-grade aqueous solutions the increase of ionic strength will lead to the formation of ion-pairs by the highly unstable anthocyanidins contributing significantly to its stabilization (Figueiredo and Pina, 1994). A possible model to account for such stabilization may have two causes: (a) an electrostatic interaction between the anion and the charged flavylum cation, displacing the equilibria toward this form, which implies a smaller rate of chalcone formation: (b) a preferable hydration of the anion, thus protecting the anthocyanin molecule against the nucleophilic water attack and consequent cleavage (Figueiredo and Pina, 1994).

Anthocyanins are very reactive toward metals (Cisse *et al.*, 2009), and can be oxidized by copper and iron (metals found in hibiscus extract). In our extract, iron concentration was found to be around 1 ppm. Studies conducted in our lab in model media containing a mixture of iron, copper and manganese revealed a significant increase in anthocyanins degradation rate (data not shown). Variation of the kinetic parameters can also be explained by the differences in composition of the studied food matrices and storage temperature but also by the methods of analysis used (individual quantitation of anthocyanins by chromatography and overall quantitation of anthocyanins by spectrophotometry).

3.3 Identification of dégradation compounds

Formation of compounds resulting from the degradation of anthocyanins was observed. Two peaks (retention times of 6.8 min and 11.8 min) were identified as protocatechuic acid and gallic acid respectively on the basis of their UV-visible spectra and results obtained by HPLC-DAD-MS (data not shown). Phloroglucinaldehyde was also detected at 35.3 min of retention time. Protocatechuic acid and gallic acid are known as degradation products of cyanidin and delphinidin respectively. Phloroglucinaldehyde is also known as a scission product of anthocyanin degradation (Kern *et al.*, 2007).

The mechanism of anthocyanin thermal degradation by scission was previously studied (Fleischhut, Kratzer, Rechkemmer & Kulling, 2006; Kern *et al.*, 2007; Markakis and Jurd, 1974; Sadilova, Stintzing & Carle, 2006; Seeram, Bourquin & Nair, 2001; Sun, Bai, Zhang, Liao & Hu, 2011). This mechanism can be adapted for the anthocyanins of *Hibiscus sadariffa* as shown in Figure 18, where anthocyanin

leads to the formation of a phenolic acid arising from the B-ring and an aldehyde resulting from the A-ring.

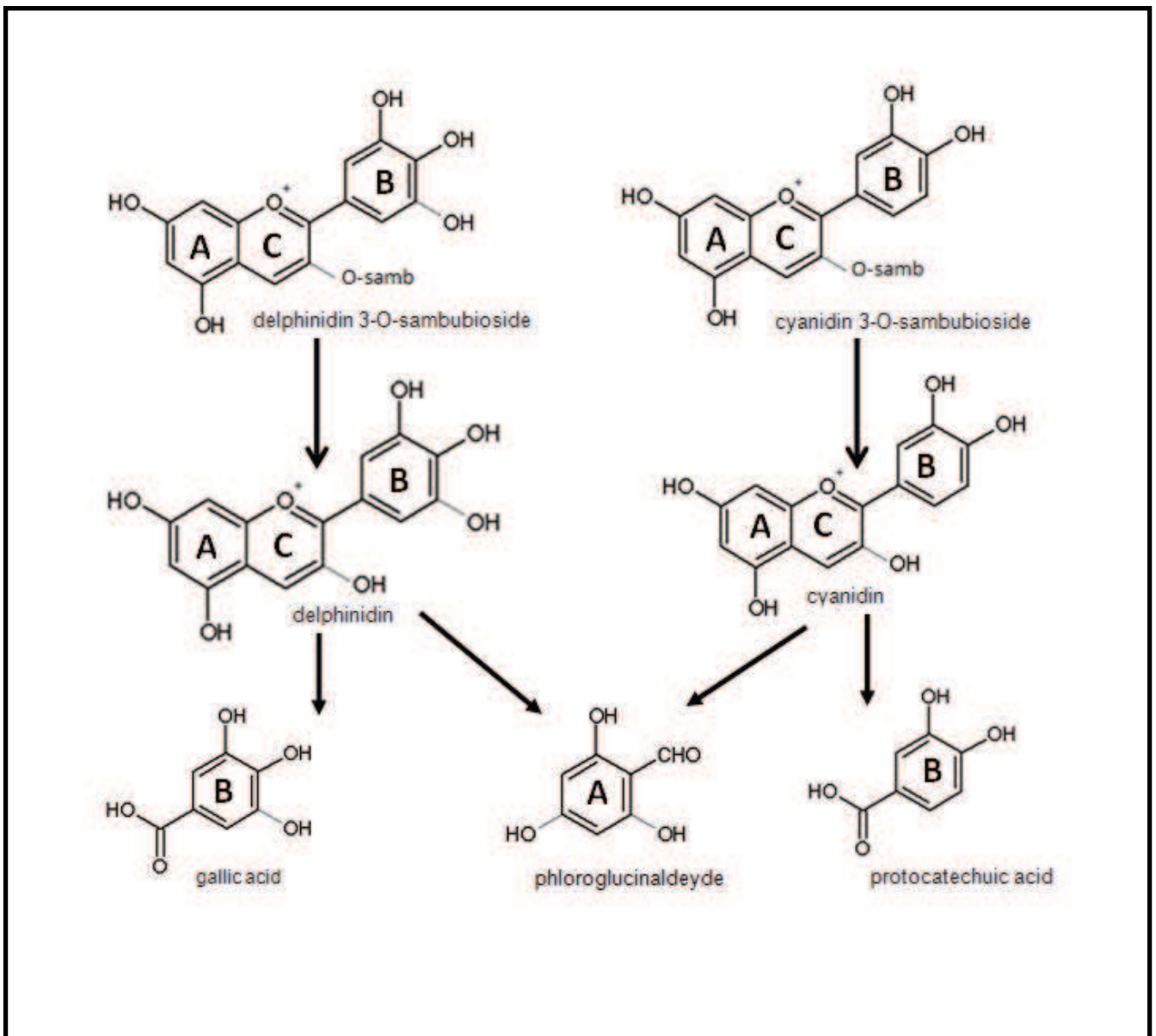


Figure 18: Mechanism of thermal degradation by scission adapted to *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins adapted from Sadilova *et al.*, 2006; Seeram *et al.*, 2001 and Sun *et al.*, 2011.

An increase in protocatechuic acid concentration of up to $0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ at a storage temperature of 37°C over 60 days was found in the present study (Figure 19).

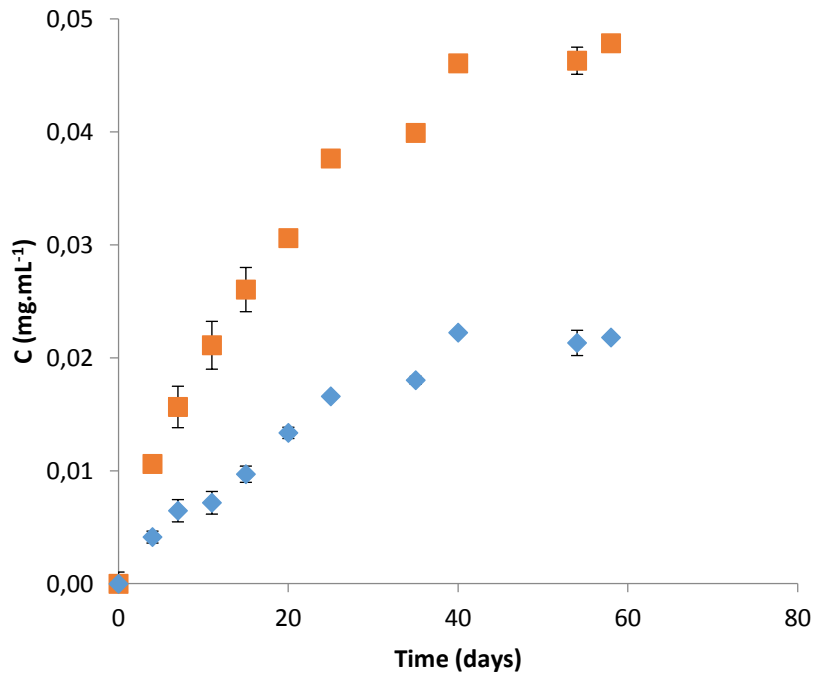


Figure 19: Evolution of scission products of delphinidin 3-O-sambubioside (■ gallic acid) and cyanidin 3-O-sambubioside (◆protocatechuic acid) during storage at 37°C of *Hibiscus sabdariffa* extracts.

In this figure it is still possible to verify the increase of gallic acid concentration up to 0.05 mg.mL⁻¹. Phloroglucinaldehyde was not quantified due to the co-elution with other peaks.

3.4 Kinetics of the evolution of the UV-VIS spectrum during storage

3.4.1 Brown index

The brown index increased during storage. The higher the temperature, the higher the brown index value (Figure 20).

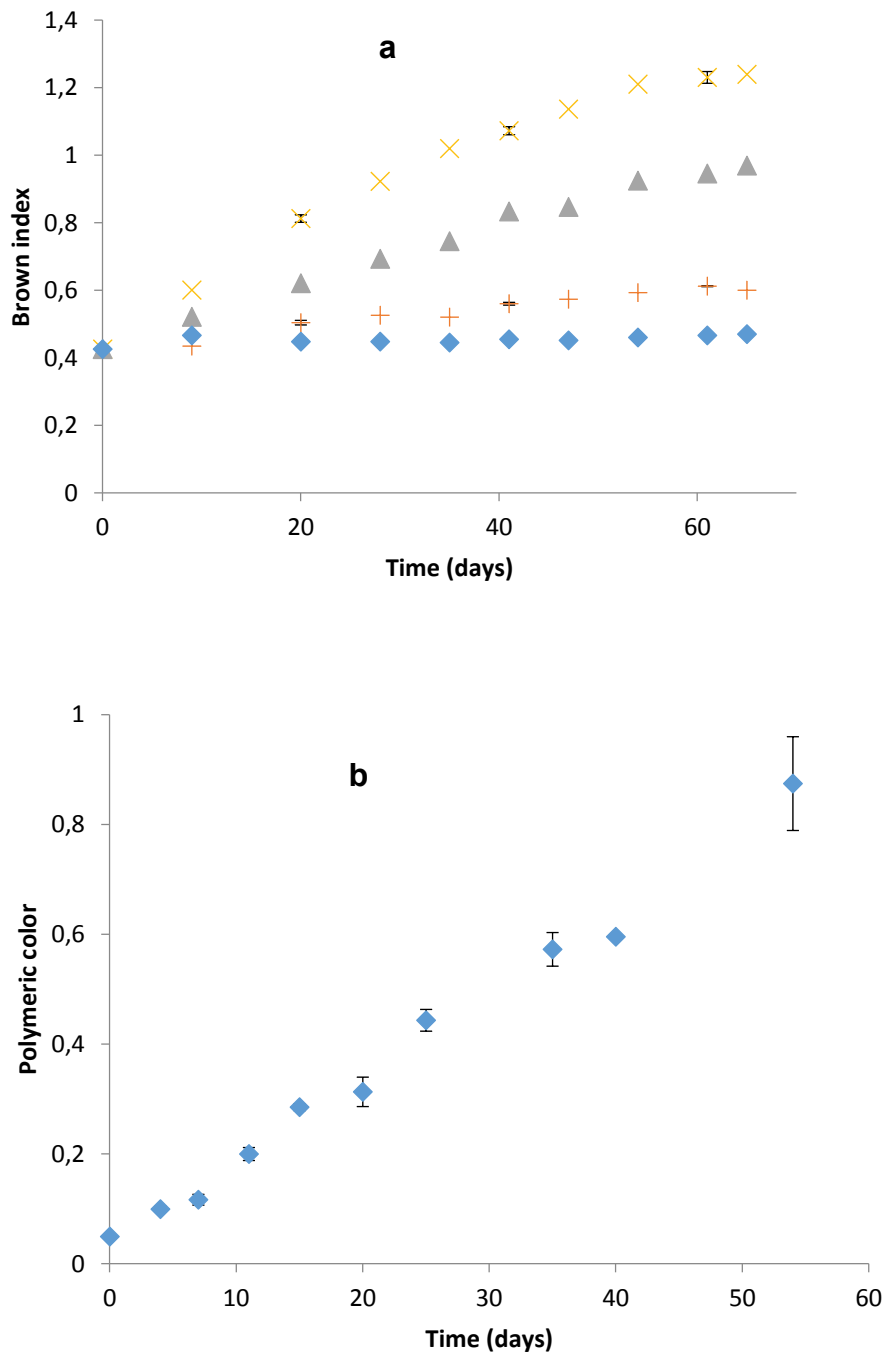


Figure 20: Brown index (a) during storage at different temperatures (♦ 4, + 20, ▲ 30 and × 37°C) and polymeric color index evolution (b) during storage at 37°C of *Hibiscus sabdariffa* extract.

At 37°C this parameter was three times higher than at 4°C over 60 days. This is in agreement with Cisse *et al.*, (2012) who found the brown index changed faster in roselle extracts with increasing storage temperature. Thermal degradation of anthocyanins led to red color loss and subsequent formation of brown color but color intensity was lower (Cisse *et al.*, 2012).

Losses in anthocyanins may be accompanied by an increase in the brown index (Brownmiller, Howard & Prior, 2008). They found that the concentrations of anthocyanin monomers in the fresh juice of blueberry decrease during storage at room temperature with losses of 48, 67 and 80% after 1, 3 and 6 months. These losses were accompanied by an increase in the brown index of 17, 25 and 42% respectively. The large increase in brown index values and corresponding loss of monomeric anthocyanins with storage in all thermally processed products may be due to several factors described previously, including copigmentation of anthocyanins with other phenolic compounds (Brownmiller *et al.*, 2008).

3.4.2 Polymeric color index

A strong impact of storage temperature on polymeric color production can be observed (Figure 20b). Polymeric color index increased by up to 0.87 after 58 days storage at 37°C. Evolution of polymeric color was strongly correlated with anthocyanin degradation (Cisse *et al.*, 2012). Tsai and Huang (2004) obtained similar results and have isolated high molecular weight fractions by Sephadex G25 powder (coarse, fractionation range: 100–5000 Da) after heat treatment of roselle extract.

Losses of total monomeric anthocyanins were accompanied by an increase in polymeric color values. This is indicative of condensation reactions of anthocyanins themselves, either with other phenolic compounds, or with other non phenolic compounds (amino acids and proteins) in the medium (Li, Guo & Wang, 2008). It is envisaged that anthocyanins were extensively polymerized during storage (Ochoa, Kessler, Vullioud & Lozano, 1999). Furthermore it must be noted that anthocyanins and other phenolic compounds, are also easily oxidized and, thus, are susceptible to oxidative degradation (Rhim, 2002). In our case, anthocyanins did not seem to condense with caffeoylquinic acids as amount of these latter compounds is constant. Anthocyanins self-condensation mechanism is more probable as degradation rate of anthocyanins increased with iron concentration (data not shown). The mechanism

might be similar to a fenton reaction with formation of a quinone and further orthoquinone (electrophilic) which react with the nucleophilic hydrated form.

Conclusion

This study allowed us to evaluate the kinetic parameters of the degradation of both main anthocyanins in a *Hibiscus sabdariffa* extract during storage at different temperatures. Anthocyanin degradation followed first order reaction kinetics. Delphinidin3-O-sambubioside ($E_a = 90 \text{ kJ.mol}^{-1}$) tended to be significantly more sensitive to an increase in temperature than cyanidin 3-O-sambubioside ($E_a = 80 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Thermal degradation of these anthocyanins resulted in the formation of scission products such as protocatechuic and gallic acids as well as phloroglucinaldehyde. An increase in polymeric color and browning indexes occurred during anthocyanin degradation. Further studies are needed to gain insight into anthocyanin degradation mechanisms of *Hibiscus sabdariffa*.

Acknowledgements

This work was supported by INAGBE, Ministério do Ensino Superior of the República de Angola and CIRAD France.

References

- Ahmed, J., Shivhare, U., & Raghavan, G. (2004). Thermal degradation kinetics of anthocyanin and visual colour of plum puree. *European Food Research and Technology*, 218(6), 525-528.
- Alighourchi, H., & Barzegar, M. (2009). Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Food Engineering*, 90, 179–185.
- Brownmiller, C., Howard, L., & Prior, R. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, 73(5), H72-H79.
- Cemeroglu, B., Velioglu, S., & Isik, S. (1994). Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *Journal of Food Science*, 59(6), 1216-1218.
- Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., Ndiaye, A., Reynes, M., & Sock, O. (2009). Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations. *Fruits*, 64(3), 179-193.
- Cisse, M., Vaillant, F., Kane, A., Ndiayea, O., & Dornier, M. (2012). Impact of the extraction procedure on the kinetics of anthocyanin and colour degradation of roselle extracts during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1214–1221.
- Clifford, L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MSn Identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900-2911.
- Danisman, G., Arslan, E., & Toklucu, A. K. (2015). Kinetic Analysis of Anthocyanin Degradation and Polymeric Colour Formation in Grape Juice during Heating. *Food Chemistry*, 33(2), 103-108.
- de Lavie, R. (2012). *Advanced Excel for Scientific Data Analysis* (3 ed.). Brunswick, Maine USA: Atlantic Academic LLC.
- Du, C. T., & Francis, F. J. (1973). Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Journal of Food Science*, 38, 810-812.
- Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 129-141.
- Figueiredo, P., & Pina, F. (1994). Formation of anthocyanin ion-pairs. A copigmentation effect. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 2(4), 775-778.

- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., & Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, 45(1), 7-18.
- Gradinaru, G., Biliaderis, C. G., Kallithraka, S., Kefalas, P., & Garcia-Viguera, C. (2003). Thermal stability of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry*, 83(3), 423–436.
- Juliani, H. R., Welch, C. R., Wu, Q., Diouf, B., Malainy, D., & Simon, J. E. (2009). Chemistry and Quality of Hibiscus (Hibiscus sabdariffa) for Developing the Natural-Product Industry in Senegal. *Journal of Food Science*, 74(2), S113-S121.
- Kern, M., Fridrich, D., Reichert, J., Skrbek, S., Nussner, A., Hofem, S., Vatter, S., Pahlke, G., Rüfer, C., & Marko, D. (2007). Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(9), 1163-1172.
- Kirca, A., & Cemeroglu, B. (2003). Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chemistry*, 81(4), 583-587.
- Kirca, A., & Cemeroglu, B. (2007). Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*, 103(4), 8541-8548.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108(1), 1-13.
- Markakis, P. & Jurd, L. (1974). Anthocyanins and their stability in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 4(4), 437-456.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet franc, Merlot, and Pinot noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4009-4017.
- Milena, M., Ramirez, R., Maria, L. P., Alberto, A., Murat, O. B., & Maurice, R. M. (2011). Physicochemical and Phytochemical Properties of Cold and Hot Water Extraction from Hibiscus sabdariffa. *Journal of Food Science*, 76(3), 228-235.
- Mourtzinou, I., Makris, D. P., Yannakopoulou, K., Kalogeropoulos, N., Michali, I., & Karathanos, V. T. (2008). Thermal Stability of Anthocyanin Extract of Hibiscus

- sabdariffa L. in the Presence of Cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10303–10310.
- Ochoa, M., Kessler, A., Vullioud, M., & Lozano, J. (1999). Physical and chemical characteristics of raspberry pulp: storage effect on composition and color. *LWT-Food Science and Technology*, 32(3), 149-153.
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwarib, 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).
- Peleg, M., Kim, A. D., & Normand, M. D. (2015). Predicting anthocyanins' isothermal and non-isothermal degradation with the endpoints method. *Food Chemistry*, 187, 537-544.
- Redus, M., Baker, D. C., & Dougall, D. K. (1999). Rate and equilibrium constants for the dehydration and deprotonation reactions of some monoacylated and glycosylated cyaniding derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (8), 3449-3454.
- Rhim, J.-W. (2002). Kinetics of thermal degradation of anthocyanin pigment solutions driven from red flower cabbage. *Food Science and Biotechnology*, 11(4), 361-364.
- Rubinskiene, M., Viskelis, P., Jasutiene, I., Viskeliene, R., & Bobinas, C. (2005). Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Research International*, 38(8), 867-871.
- Sadilova, E., Stintzing, F., & Carle, R. (2006). Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *Journal of Food Science*, 71(8), C504-C512.
- Seeram, N. P., Bourquin, L. D., & Nair, M. G. (2001). Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10), 4924-4929.
- Somers, T. (1968). Pigment profiles of grapes and of wines. *Vitis*, 7, 303-320.
- Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., & Wrolstad, W. E (2002). Color and antioxidant properties of cyaniding-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6172-6181.
- Sun, J., Bai, W., Zhang, Y., Liao, X., & Hu, X. (2011). Identification of degradation pathways and products of cyanidin-3-sophoroside exposed to pulsed electric field. *Food Chemistry*, 126(3), 1203-1210.

- Thilakarathna, S. H., & Rupasinghe, H. (2013). Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 5(9), 3367-3387.
- Tsai, P.-J., & Huang, H.-P. (2004). Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. *Food Research International*, 37(4), 313-318.
- Türkyılmaz, M., & Özkan, M. (2012). Kinetics of anthocyanin degradation and polymeric colour formation in black carrot juice concentrates during storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(11), 2273-2281.
- Van Boekel, M. A. J. S. (2009). *Kinetic Modeling of Reactions in Foods*. Broken Sound Pkwy NW, Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group, LLC.
- Vidot, K., Achir, N., Mertz, C., Sinela, A., Rawat, N., Prades, A., Dangles, O., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2016). Effect of temperature on acidity and hydration equilibrium constants of delphinidin-3-O- and cyanidin-3-O-sambubioside calculated from uni- and multi-wavelength spectroscopic data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 4139-4145.
- Wong, P.-K., Yusof, S., Ghazali, H., & Che Man, Y. (2002). Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition & Food Science*, 32(2), 68-73.
- Zozio, S., Pallet, D., & Dornier, M. (2011). Evaluation of anthocyanin stability during storage of a coloured drink made from extracts of the Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and black carrot (*Daucus carota* L.). *Fruits*, 66(03), 203-215.

2^{ème} partie: Effect of temperature on acidity and hydration equilibrium constants of delphinidin-3-O- and cyanidin-3-O-sambubioside calculated from uni- and multi-wavelength spectroscopic data

Kévin Vidot¹, Nawel Achir^{2*}, Christian Mertz¹, André Sinéla¹, Nadirah Rawat¹,
Alexia Prades¹, Olivier Dangles³, Hélène Fulcrand⁴, Manuel Dornier²

1 CIRAD, UMR 95 Qualisud, TA B-95/16, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

2 Montpellier SupAgro, UMR 95 Qualisud, TA B-95/16, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

3 UMR 408, University of Avignon, INRA, Safety and Quality of Plant Products, 84000 Avignon, France

4 INRA-IPV, Unité de Recherche des Polymères et des Techniques Physicochimiques, 2 place Viala, 34060 Montpellier, France

* nawel.achir@supagro.fr

1101, avenue Agropolis

34093 Montpellier Cedex 5

FRANCE

tel: +33 (0) 4 67 87 40 89

**Publication 2 : *Journal of agricultural and food chemistry*. (2016),
64 (20), 4139-4145**

Lors du chauffage, les anthocyanes peuvent être dégradés de façon irréversible selon plusieurs voies en fonction du pH. Après hydrolyse thermique de la liaison glycosidique en C3, la scission du noyau C de la forme chalcone peut être, par exemple, très rapide (publication 1). Par conséquent, la répartition des différentes formes d'anthocyanes en équilibre en fonction du pH et de la température est essentielle pour l'étude de leur stabilité. Elle passe par la détermination des constantes d'acidité (K_a) et d'hydratation (K_h) à différentes températures. Généralement, une valeur de K_h faible indique que la forme flavylium plus stable est prédominante ce qui limite les modifications de couleur par hydratation.

La 2^{ème} partie de ce chapitre décrit, sous forme d'un article publié dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, l'effet de la température sur les constantes d'équilibre (K_a) et (K_h) de la delphinidine 3-O-sambubioside et la cyanidine 3-O-sambubioside. La méthode classique à longueur d'onde unique est comparée à la méthode de résolution de courbes en spectrophotométrie (MCR-ALS). Les valeurs de ces constantes d'équilibre sont également estimées dans l'extrait d'hibiscus pour évaluer l'effet de la matrice naturelle sur la répartition des formes d'anthocyanes.

Au pH entre 2 et 8, les deux anthocyanes sont principalement sous leurs formes flavylium (rouge) en équilibre avec la base quinonique (violet) et l'hémicétal (incolore). Leurs constantes d'acidité et d'hydratation ont été obtenues à partir de la méthode de saut de pH, suivie par spectroscopie UV-VIS en fonction de la température de 4 à 37 °C. Les constantes d'acidité et d'hydratation de la cyanidine 3-O-sambubioside à 25 °C sont de $4,12 \cdot 10^{-5}$ et $7,74 \cdot 10^{-4}$ respectivement. Elles sont significativement plus élevées pour la delphinidine 3-O-sambubioside ($4,95 \cdot 10^{-5}$ et $1,21 \cdot 10^{-3}$). La MCR a permis d'évaluer la concentration et le spectre d'absorption de chaque forme mais surestime les valeurs des constantes d'équilibre. Cependant, les 2 méthodes montrent que la formation de la base quinonique et de l'hémicétal sont des réactions endothermiques. Les constantes d'équilibre dans l'extrait d'hibiscus sont comparables à celles obtenues avec les anthocyanes seules en solution.

ABSTRACT

Delphinidin-3-O-sambubioside and cyanidin-3-O-sambubioside are the main anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* calyces, traditionally used to make a bright red beverage by decoction in water. At natural pH, these anthocyanins are mainly in their flavylium form (red) in equilibrium with the quinonoid base (purple) and the hemiketal (colorless). For the first time, their acidity and hydration equilibrium constants were obtained from a pH-jump method followed by UV-VIS spectroscopy as a function of temperature from 4 to 37°C. Equilibrium constant determination was also performed by multivariate curve resolution (MCR). Acidity and hydration constants of cyanidin 3-O-sambubioside at 25°C were 4.12×10^{-5} and 7.74×10^{-4} respectively and were significantly higher for delphinidin-3-O-sambubioside (4.95×10^{-5} and 1.21×10^{-3} respectively). MCR enabled the obtaining of concentration and spectrum of each form but led to overestimated values for the equilibrium constants. However, both methods showed that formations of the quinonoid base and hemiketal were endothermic reactions. Equilibrium constants of anthocyanins in the hibiscus extract showed comparable values as for the isolated anthocyanins.

Keywords: Anthocyanin, cyanidin-3-O-sambubioside, delphinidin-3-O-sambubioside, pH-jump, MCR, UV-vis, equilibrium constant, *Hibiscus sabdariffa* extract.

1. Introduction

Calyces of *Hibiscus sabdariffa* are traditionally used to prepare a red beverage called Bissap by decoction in water. This strong red coloration is due to an important concentration of 40 mg/g of two main anthocyanins present in the calyces: delphinidin-3-O-sambubioside (Del-3Sb) and cyanidin-3-O-sambubioside (Cya-3Sb)¹. One problem during the storage of the beverage is the instability of anthocyanins leading to an undesirable color change². Indeed, the flavylium structure of anthocyanin, which is responsible for the red color, can undergo several structural modifications³. The flavylium cation (AH⁺) is in equilibrium with two main forms, which are the quinonoid base (A) and the hemiketal (B) (Figure 21).

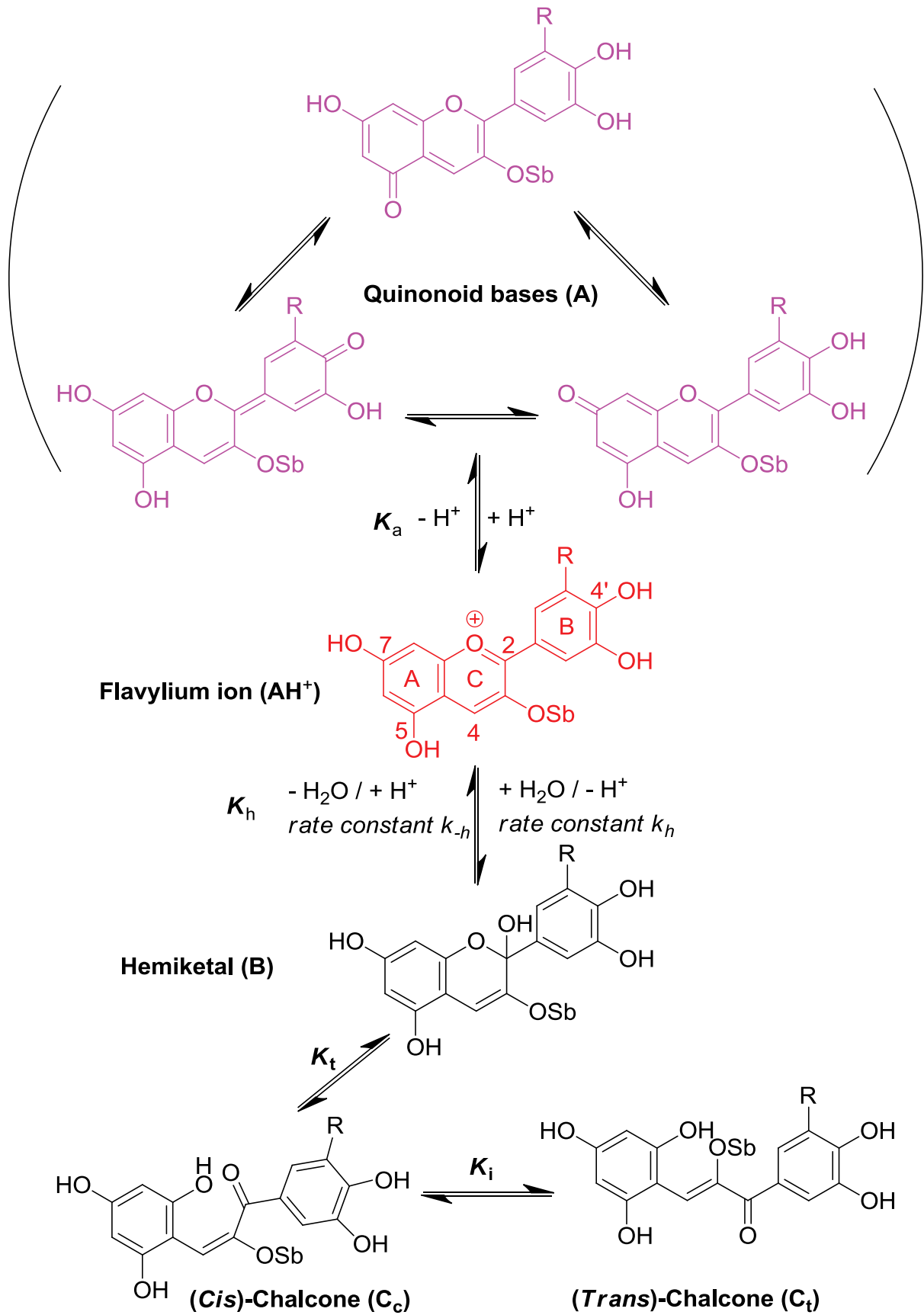


Figure 21. Structural transformations of anthocyanins in mildly acidic aqueous solution. R = H, Cya-3Sb; R = OH, Del-3Sb (Sb = β -D-xylosyl- (1 \rightarrow 2)- β -D-glucosyl).

Depending on the pH, the quinonoid base (a mixture of tautomers with the 7-keto tautomer making the major contribution) results from a very fast proton loss from one acidic OH group (at C4', C5 or preferentially at C7) while the hemiketal is formed by the much slower addition of a water molecule to the electrophilic C2 center with concomitant proton loss. Hemiketal B is in fast cycle – chain equilibrium with minor concentrations of *cis*-chalcone (C_c), itself in very slow equilibrium with the corresponding *trans*-chalcone (C_t). These equilibria are characterized by the acidity and overall hydration constants K_a and K'_h (Fig. 1): $K_a = (H^+)(A)/(AH^+)$, $K'_h = (H^+)[(B) + (C_c) + (C_t)]/(AH^+) = K_h[1 + K_t(1 + K_i)]$. These different structures have very distinct spectral properties as A is purple, B colorless and the chalcones pale yellow.

Upon heating, irradiation or metabolism, anthocyanins are also known to go through several irreversible degradation pathways depending on pH⁴⁻⁷. In particular, after chemical or enzymatic hydrolysis of the glycosidic bond at C3-OH, the chalcone forms undergo fast irreversible C-ring cleavage. Therefore, the quantification of the different anthocyanin forms as a function of pH and temperature, and thus the preliminary determination of the acidity and hydration constants at different temperatures, are important steps for studying the stability of anthocyanins and rationalizing the observed color changes. The equilibrium constants may vary firstly as a function of the anthocyanin structure: B-ring substitution, extent of glycosidation (e.g., 3-glycoside vs. 3,5-diglycosides), type of sugar residues (Table 17). To our knowledge, the equilibrium constants of delphinidin-3-O-sambubioside and cyaniding 3-O-sambubioside have not been estimated yet.

Table 17. Hydration equilibrium constants of some anthocyanins⁸⁻¹⁰.

Anthocyanins	pK'_h	K'_h ($\times 10^{-3}$)
Cyanidin-3-O-xylosyl-galactoside	3.13 (\pm 0.02)	0.74
Cyanidin-3-O-glucoside	3.01 (\pm 0.04)	0.98
Malvidin-3-O-glucoside	2.60 (\pm 0.01)	2.51
Malvidin-3,5-O-diglucoside	1.85 (\pm 0.02)	14.13

Generally, anthocyanin equilibrium constants are determined by a pH-jump method which allows the monitoring of the hydration kinetics as a function of pH⁹ or by simple titration on fully equilibrated solutions¹⁰. The former method allows the determination of both K_a and K'_h while the latter only provides $K_a + K'_h$. The color changes are monitored by absorbance measurement at a single wavelength, usually at 520 nm¹⁰. Recently, a Brazilian team recorded the absorbance values at all wavelengths of the UV-visible spectra and used multivariate curve resolution (MCR) to obtain the concentration of each form in equilibrium after deconvolution of the spectra¹¹. However, this technique has never been tested on pure anthocyanins and compared to the values obtained with the usual single wavelength method.

In this context, the present study reports on the determination of the acidity and hydration equilibrium constants of Del-3Sb and Cya-3Sb as a function of temperature mimicking different storage conditions, using the usual single wavelength method and the alternative MCR method. The estimation of these equilibrium constants is also attempted directly in the *Hibiscus sabdariffa* extract in order to analyze the effect of the natural matrix on the distribution of the anthocyanin forms.

2. Material and methods

2.1 Solution preparation

Pure anthocyanin solutions. Commercial cyanidin-3-O-sambubioside chloride and delphinidin-3-O-sambubioside chloride (Extrasynthese, France) were dissolved separately in malic acid solution (0.1M - pH 2.2) to obtain anthocyanin solutions at 1.2×10^{-4} M. All solutions were equilibrated at the temperature of experiments one hour before use.

Extract of *Hibiscus sabdariffa*. In natural medium, apparent anthocyanin equilibrium constants are known to be sensitive to any compound susceptible to interact in a discriminate fashion with the colored and colorless forms of anthocyanins. Hence, apparent hydration and acidity constants were also evaluated in the *Hibiscus sabdariffa* extract. *Hibiscus sabdariffa* extract was obtained by soaking calyx powder in water at a ratio 1/9 (g/g) during 30 min and by filtration. Previous experimental characterization of the extract showed that the pH equaled 2.2

with malic acid as main organic acid. The main anthocyanins are delphinidin 3-O-sambubioside (70%) and cyanidin-3-O-sambubioside (30%)¹. A 1/10 dilution of the extract in malic acid (Sigma-Aldrich, France) solution (0.1M - pH 2.2) was made before UV-VIS measurements.

Sodium hydroxide solutions: Twelve sodium hydroxide (Sigma-Aldrich, France) solutions of concentration ranging from 1.0×10^{-2} to 1.2×10^{-1} M were prepared, and depending on working temperature, only ten solutions were chosen for the experiment (4°C, 15°C and 25°C: [NaOH] = 1.0×10^{-2} to 1.0×10^{-1} M ; for 30°C and 37°C: [NaOH] = 3.0×10^{-2} to 1.2×10^{-2} M).

2.2 pH-jump experiments

The pH jump method was carried out according to the literature (Brouillard and Delaporte 1977). The equilibrium was perturbed by a sudden change in H⁺ concentration and the absorbance from 240 to 800 nm (each 0.5 nm) was recorded as a function of time with a diode-array spectrophotometer (Specord S600 Analytik Jena, Germany) thermostated by a F250 cryostat (Julabo, Germany). To do so, 1 mL of equilibrated anthocyanin solution was put in a quartz cell (d = 1 cm) equipped with a stirring magnet. Then, 1 mL of NaOH solution of concentration ranging from 1.0×10^{-2} to 1.2×10^{-1} M was quickly added to the cell, and the spectra were immediately recorded every second over 1 min or 1.5 min, until reaching the hydration equilibrium. The final pH value was carefully measured with an Inolab 7110 (WTW, Germany) pH-meter combined to a SenTix®Mic-D (WTW, Germany) electrode and ranged from 2.5 to 4.5. This set of 10 kinetic experiments was performed for both pure anthocyanins in solution, Cya-3Sb and Del-3Sb, at five different temperatures 4°C, 15°C, 25°C, 30°C and 37°C. This experiment was also repeated on the anthocyanin extract of hibiscus at 25°C. Three replicates were done for each temperature.

The spectra of the solution in which the anthocyanin is exclusively under the flavylum form (pH<1) was obtained after addition of 20µL of concentrated HCl (37%).

2.3 Equilibrium constant determination

pH-Jump method: This method was described in the literature¹². The color loss following the sudden pH increase was monitored at 520 nm for Del-3Sb and at 515 nm for Cya-3Sb, and at 522 nm for the *Hibiscus* extract and used to estimate the

apparent first-order rate constant of hydration (k_h^{obs}) according to equation 1, linearized in equation 2.

$$A = A_{eq} + (A_0 - A_{eq})exp(-k_h^{obs}t) \quad (1)$$

$$\ln \frac{A - A_{eq}}{A_0 - A_{eq}} = -k_h^{obs}t \quad (2)$$

Where A_{eq} is the equilibrium absorbance, A_0 the initial absorbance just after pH-jump and A the absorbance value measured over time t . At least ten (pH, k_h^{obs} , A_{eq}) triplets were obtained.

The acidity and overall hydration constants (K_a , K'_h) were estimated as follows. Firstly, the following linear relationship between $A_f / (A_f - A_{eq})$ and 10^{-pH} (equation 3) applies:

$$\frac{A_f}{A_f - A_{eq}} = \frac{K'_h + K_a}{K'_h + K_a(1 - r_A)} + \frac{10^{-pH}}{K'_h + K_a(1 - r_A)} \quad (3)$$

Where A_f is the absorbance of the strongly acidic solution (pH < 1) of anthocyanin (100% flavylum form) and r_A , the following ratio of molar absorption coefficients: $\mathcal{E}_A / \mathcal{E}_{AH^+}$.

The sum $K'_h + K_a$ was thus extracted from the intercept/slope ratio.

Finally, the $(K_a + K'_h + 10^{-pH}) / k_h^{obs}$ vs. 10^{pH} relationship enabled the differentiation of the hydration and acidity constants (equation 4, see *Annex for a brief derivation*):

$$\frac{K_a + K'_h + 10^{-pH}}{k_h^{obs}} = \frac{1 + K_t}{k_{-h}} + \frac{K_a(1 + K_t)}{k_{-h}} 10^{pH} \quad (4)$$

Where k_{-h} represents the rate constant of the dehydration process.

The slope/intercept ratio thus gave K_a . From the $K_a + K'_h$ sum previously determined, K'_h can be estimated.

It must be noted that spectral monitoring over a few min after pH-jumps is not enough to ensure total conversion of C_c into C_t . Hence, the K'_h value thus determined is actually defined as: $K'_h = (H^+)[(B) + (C_c)] / (AH^+) = K_h(1 + K_t)$. However, spectral measurement at full equilibrium ($t \approx 1h$) gave only very slightly lower A_{eq} values, meaning that C_t is a very minor species for both anthocyanins ($K_i \ll 1$).

Multivariate Curve Resolution method: Multivariate Curve Resolution aims at achieving a bilinear decomposition in two matrices of an experimental absorbance matrix D which corresponds to a combination of spectrophotometric measurement. The two matrices correspond to the concentrations C of the individual compounds and the normalized spectra S^T . The underlying law that links the two-way data matrix $D(m,n)$ to $C(m,k)$ and $S^T(k,n)$ is a generalization of the Beer-Lambert law applied for all wavelengths (Eq. 5) :

$$D(m,n) = C(m,k) S^T(k,n) + E(m,n) \quad (5)$$

With k , the number of species of the unknown mixture and $E(m,n)$, the error matrix. Resolution of Eq (5) is carried out by an iterative process that stops when the error (E) is minimum. This procedure can generate a lot of solutions and some of them are chemically impossible. Therefore, data quality in the optimization process is improved by the addition of optimization constraints with physical or chemical sense¹³. Two constraints were tested, the non-negativity of concentration and spectra and the closure, which refers to achievement of mass balance. Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS) was carried out with Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) using a toolbox build by Jaumot *et al.* (2005) with the constraint algorithms: fast non-negative least square and closure¹⁴. To determine equilibrium constants on anthocyanin solutions and *Hibiscus* extract, MCR-ALS was applied on all spectrophotometric data obtained with the 10 different pH values. For each experiment, the total spectrum (from 240 to 800 nm, each 0.5 nm) was recorded for 21 sampling times spread over 1 to 1.5 min. Therefore, for each final pH value, a [1120, 21] matrix was obtained. The ten matrices obtained were column-wise augmented¹⁴, which results in a [11200, 21] total matrix on which MCR-ALS was applied.

From the different matrices obtained after resolution, some quality parameters of the solution were calculated (Eq. 6 and 7):

$$\text{- Lack of fit} = 100 \times \sqrt{\frac{\sum(\text{residus})^2}{\sum(\text{initial matrix})^2}} \quad (6)$$

$$\text{- Variance explained (R}^2\text{)} = \frac{\sum(\text{initial matrix})^2 - \sum(\text{residus})^2}{\sum(\text{initial matrix})^2} \quad (7)$$

Thermodynamic parameters. For the proton transfer and hydration equilibria standard enthalpy and entropy changes (ΔH^0 and ΔS^0 , assumed to be temperature-independent in the range investigated) were estimated from the Van't Hoff equation:

$$\text{Ln}K = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT} \quad (8)$$

Indeed, $\text{Ln}K$ vs. $1/T$ plots were linear and the corresponding slope and intercept gave access to ΔH^0 and ΔS^0 , respectively.

3. Results

3.1 pH-Jump method

The quantitative treatment of the experimental spectrophotometric data led to three different graphs with a satisfactory correlation coefficient for the expected straight lines ($R^2 > 0.95$) as shown in Figure 22.

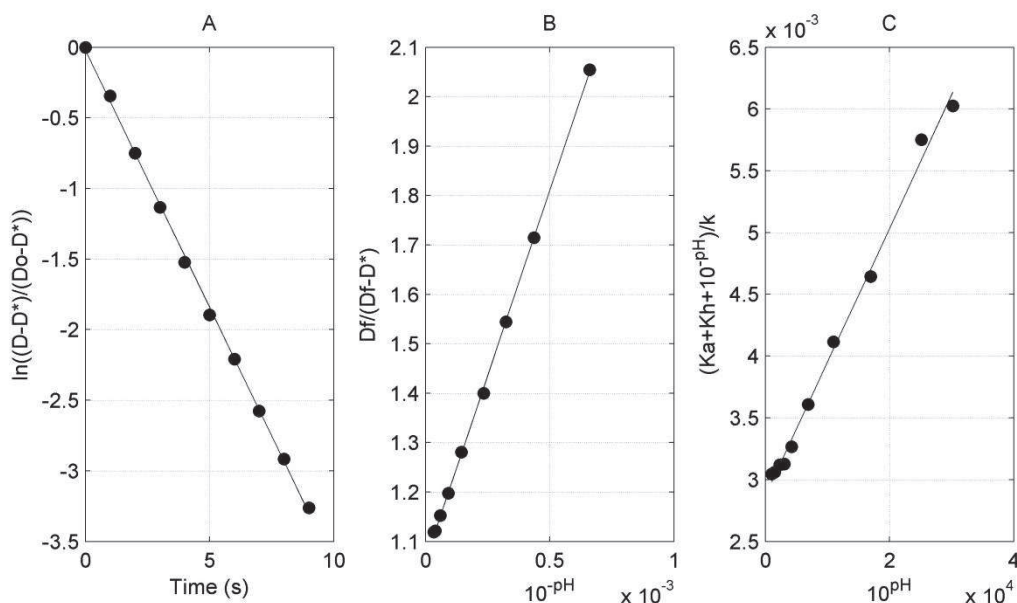


Figure 22. Treatment of data obtained by the pH-jump method for one experiment at 25°C with cyanidin-3-O-sambubioside. A: estimation of the apparent first-order rate

constant (k_{obs}) according Eq. 2, B: determination of the $K_a + K'_h$ sum according Eq.3, C: determination of K_a according Eq. 4.

As found in literature for malvidin-3-glucoside⁸, the pH-jump data (Table 18) showed that K_a values were lower than K'_h for both anthocyanins. For example, at 25°C, K'_h was 19-fold higher than K_a for Cya-3Sb, and 24-fold higher for Del-3Sb. This is consistent with the typical properties of common naturally occurring anthocyanins¹⁵: in the concurrent fates of the flavylum ion, proton loss and hydration, the former is kinetically favored while the latter is thermodynamically favored.

Table 18. Acidity and hydration equilibrium constants of cyanidin-3-O-sambubioside (Cya-3Sb) and delphinidin-3-O-sambubioside (Del-3Sb) at different temperatures (pH-jump method).

T (°C)	Cya-3Sb		Del-3Sb		Cya-3Sb		Del-3Sb	
	K_a ($\times 10^{-5}$)	($\times 1 K'_h 0^{-4}$)	K_a ($\times 10^{-5}$)	K'_h ($\times 10^{-4}$)	pK_a	pK'_h	pK_a	pK'_h
4	2.65 (± 0.43) ^(a)	6.23 (± 0.90) ^(a)	1.70 (± 0.18) ^(a)	8.41 (± 0.53) ^(a)	4.58 (± 0.07)	3.21 (± 0.06)	4.77 (± 0.05)	3.08 (± 0.03)
15	3.19 (± 0.56) ^(a)	7.24 (± 0.44) ^(a,b)	2.66 (± 0.24) ^(b)	7.53 (± 0.18) ^(a)	4.50 (± 0.08)	3.14 (± 0.03)	4.58 (± 0.04)	3.12 (± 0.01)
25	4.12 (± 0.45) ^(b)	7.74 (± 0.88) ^(b,c)	4.95 (± 0.32) ^(c)	12.1 (± 0.31) ^(b)	4.39 (± 0.05)	3.11 (± 0.05)	4.31 (± 0.03)	2.92 (± 0.01)
30	5.46 (± 0.58) ^(c)	9.02 (± 0.86) ^(c)	4.96 (± 0.42) ^(c)	14.2 (± 0.49) ^(b)	4.26 (± 0.05)	3.05 (± 0.04)	4.31 (± 0.04)	2.85 (± 0.02)
37	5.09 (± 0.40) ^(b,c)	9.20 (± 0.32) ^(c)	5.48 (± 0.07) ^(c)	12.7 (± 0.55) ^(b)	4.29 (± 0.03)	3.04 (± 0.02)	4.26 (± 0.01)	2.90 (± 0.02)

Values are the means of three determinations with standard deviations in brackets.

Different letters in the same column refer to significantly different data ($p < 0.05$).

Our data (Table 18) also showed a significant increase of the hydration and acidity constants when temperature increases, meaning that both equilibria are endothermic. Consistently, the Van't Hoff plots yielded positive enthalpy changes for both equilibria and both anthocyanins (Figure 23).

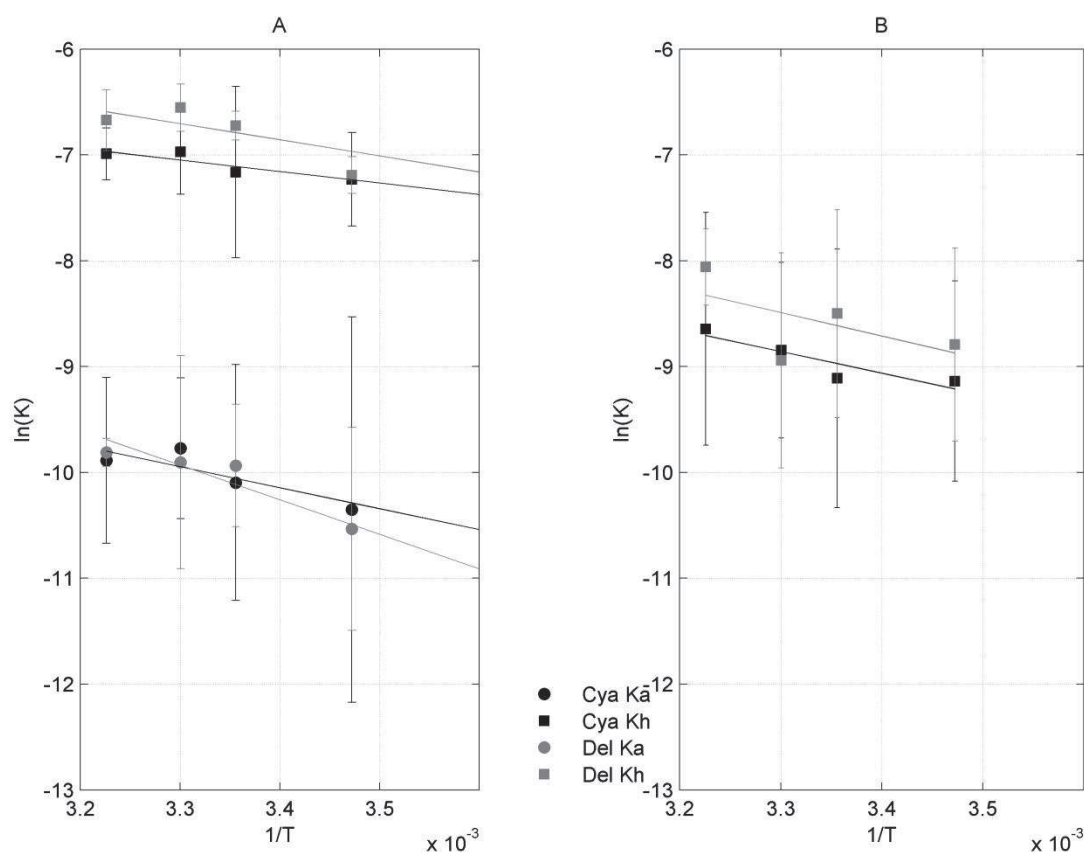


Figure 23. Van't Hoff plots (Eq. 8) for acidity and hydration equilibria. Data obtained by the pH-jump method (A) and MCR method (B) with their standard deviation.

Thus, the ΔH^0 values for the proton transfer were 27.1 (\pm 1.4) and 16.5 (\pm 3.6) kJ mol $^{-1}$ for Del-3Sb and Cya-3Sb, respectively. The corresponding values for the hydration equilibrium were 12.6 (\pm 1.9) and 9.1 (\pm 2.9) kJ mol $^{-1}$. The literature also indicates that formations of the quinonoid base and hemiketal are endothermic⁸⁻¹⁰. This fact could favor anthocyanin degradation at higher temperature during storage or processing¹⁶ as colorless forms are typically more prone to degradation¹⁷. In addition, the slightly higher K_h values for Del-3Sb compared to Cya-3Sb is also consistent with papers reporting a higher sensitivity of delphinidin-3-glucoside to degradation, compared to cyanidin-3-glucoside^{18,19}.

However, this difference can also be ascribed to delphinidin glycosides having electron-rich B-rings, which are more prone to autoxidation.

Finally, the equilibrium constants were slightly different for the two anthocyanins in agreement with differences in their chemical stability. Formations of the quinonoid base and hemiketal from the flavylium ion were both endothermic and thus favored at higher temperature.

3.2 MCR method

A typical result for Cya-3Sb is shown in Figure 24.

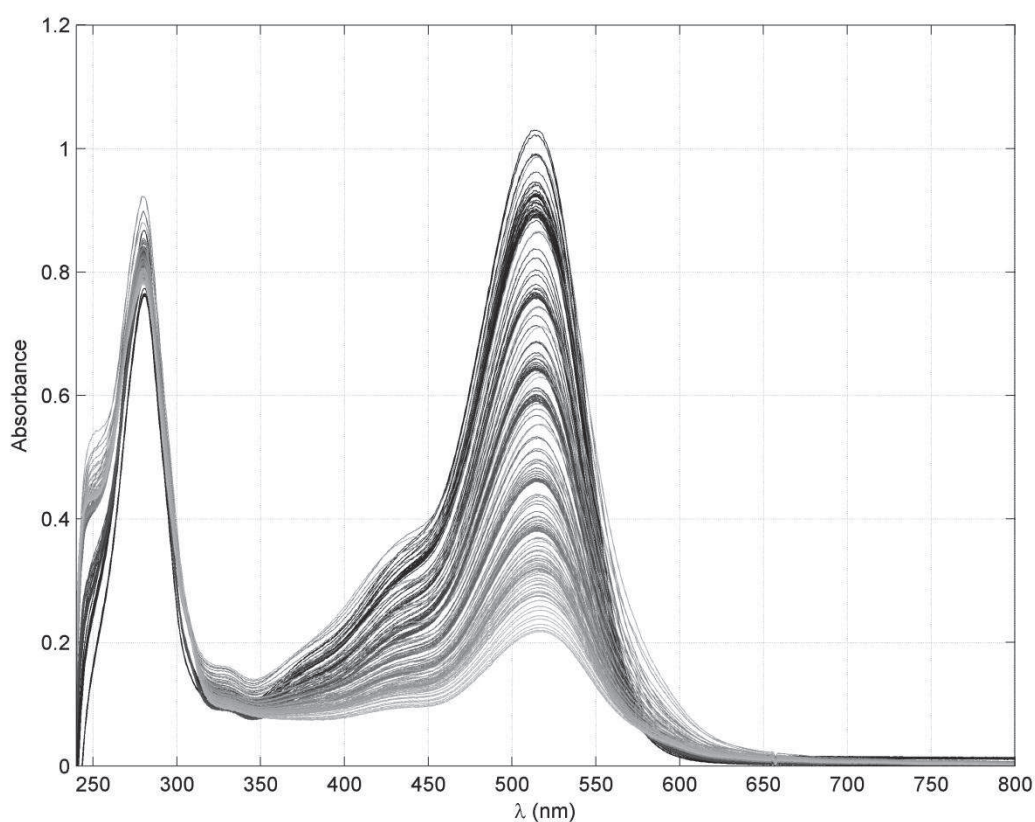


Figure 24. Complex UV-VIS spectra of cyanidin-3-O-sambubioside at 25°C

This figure shows the complex spectra (made of the response of the three species in equilibrium AH^+ , A and B) of the 21 samples at the different pH values. An important variation in the absorbance at 520 nm is observed as a function of time and pH which is due to changes in the concentrations of the colored forms AH^+ and A. The results of MCR-ALS with the constraint of non-negativity are presented in Figure 25 with the normalized spectra (part A) and concentrations (part B) of pure compounds.

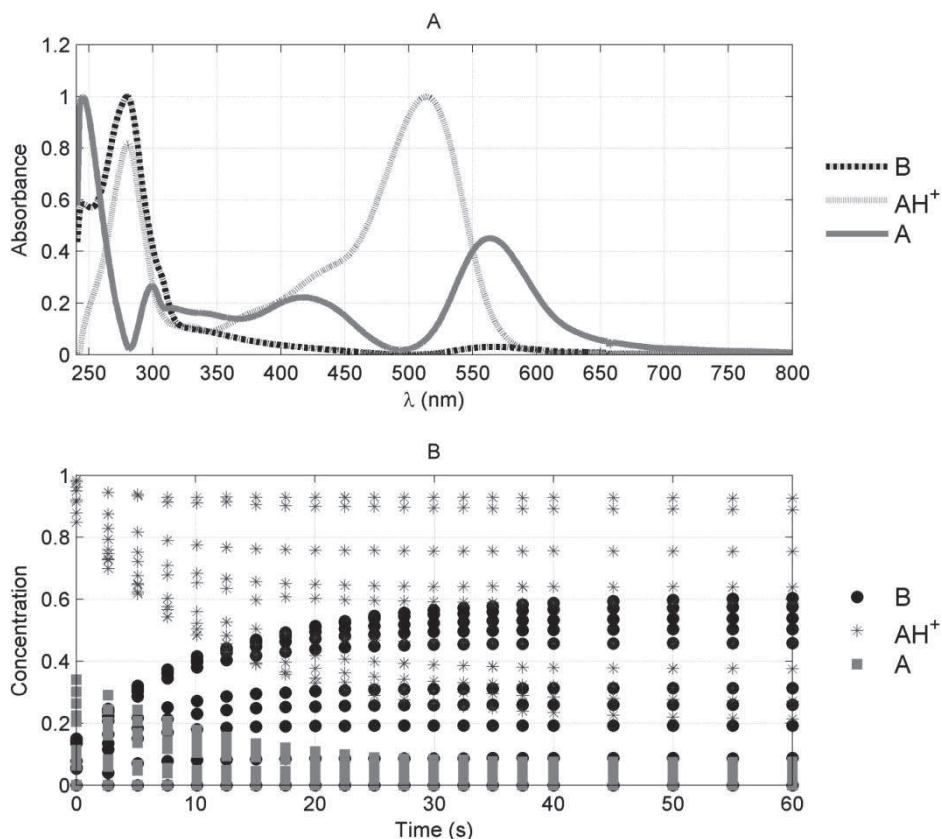


Figure 25. Normalized spectra of the three pure compounds (part A) and time dependence of their concentration (part B) deduced from MCR-ALS with experimental data of Figure 24.

The convergence was achieved and the mathematical solution led to lack of fit inferior to 1% and a percent of variance explained (R^2) of 0.99. For each assay, the most probable number of pure compounds was three, which is coherent with the pH-jump method and the literature in this pH range²⁰.

The resulting three spectra were very different. A spectrum was very close to the spectrum obtained at pH < 1 when the flavylum cation is the sole species. Therefore, this compound can be safely identified to AH⁺. A second compound had no significant absorption in the visible region but absorbed around 280 nm. The tail at lower energies was probably due to some cis-chalcone. As the equilibrium B/Cc is very fast, this spectrum should contain both contributions of hemiketal B and cis-chalcone Cc. The third spectrum should be the quinonoid base. It was characterized by two absorption maxima at 420 and 560 nm. This feature is in

agreement with experimental spectra obtained from fast (stopped-flow) data acquisition. As proton transfer is very fast, by setting a $\text{pH} > \text{pK}_a + 1$, the initial spectra (just after fast mixing of the anthocyanin and NaOH solutions) correspond to a solution in which the quinonoid base largely prevails ($> 90\%$)²¹. Interestingly, the two maxima in the spectrum of A are consistent with A being a mixture of two main tautomers (among the three possible, see Figure 21).

The time dependence of the pure compound concentrations is presented on Figure 25B for one pH value. As expected, the concentration of AH^+ decreased exponentially with time and the amplitude of the decay increased with pH. Concentrations of A were highest at time 0 in agreement with a very fast proton loss converting AH^+ into A^{9,21}. Finally, the sole accumulating specie was, as expected, the thermodynamic product B.

From Figure 25, the percentage values of the different forms in equilibrium can be plotted as a function of pH to obtain the pK'_h value at the crossing of the AH^+ and B curves (Figure 26).

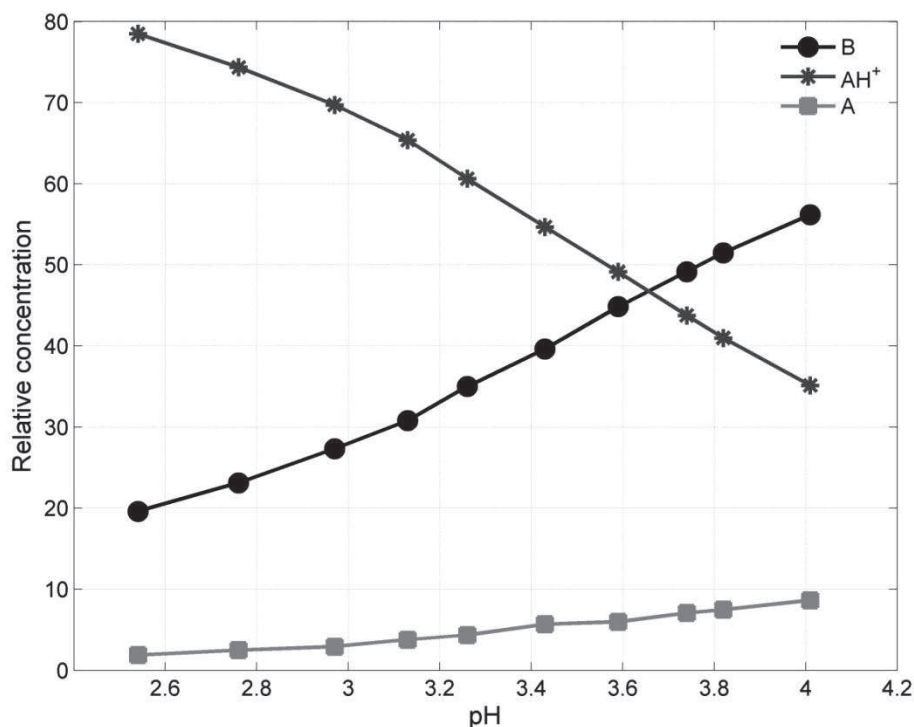


Figure 26. Distribution diagram of the different Del-3Sb forms in equilibrium as a function of pH, deduced from MCR analysis at 25°C.

From MCR-ALS, pK'_h values were calculated for each anthocyanin and each temperature (Table 19). Despite the satisfactory trends of pure spectra and concentration profiles, pK'_h values were found to be overestimated, compared to pH-jump and literature values (Table 17 and 18). Moreover, the shift to higher values was also observed for pK_a because the pH range of the experiments did not allow estimations by MCR. Therefore, the accuracy of equilibrium values obtained by MCR was not satisfactory. However, as seen in Table 19, the trend observed for the temperature dependence of pK'_h was the same as in the pH-jump method. Indeed, from 4 to 37°C, K'_h increased for both anthocyanins by a factor 1.5 – 2.0 in both methods. Moreover, the Van't Hoff equation again gave positive hydration enthalpies (Figure 23), 18.5 (\pm 8.9) and 16.9 (\pm 2.1) kJ mol⁻¹ for Del-3Sb and Cya-3Sb, respectively. Thus, differences between ΔH^0 values for the two anthocyanins were the same for both methods.

Table 19. Hydration equilibrium constants of cyanidin-3-O-sambubioside and delphinidin-3-O-sambubioside at different temperatures from the MCR method

T(°C)	Cya-3Sb	Del-3Sb	Cya-3Sb	Del-3Sb
	K'_h ($\times 10^{-4}$)	K'_h ($\times 10^{-4}$)	pK'_h	pK'_h
4	<i>undefined</i>	<i>undefined</i>	<i>undefined</i>	<i>undefined</i>
15	1.08 (\pm 0.11)	1.52 (\pm 0.36)	3.97	3.82
25	1.10 (\pm 0.15)	2.04 (\pm 0.23)	3.96	3.69
30	1.44 (\pm 0.13)	2.29 (\pm 0.13)	3.84	3.64
37	1.76 (\pm 0.22)	3.16 (\pm 0.14)	3.75	3.50

3.3 Equilibrium constant in *Hibiscus sabdariffa* extract

In *Hibiscus sabdariffa* extract, some copigments, i.e. natural colorless polyphenols (mainly, hydroxycinnamic acids, flavones and flavonols) can selectively stack onto the colored forms of anthocyanin, thereby protecting them from water addition and subsequent fading²². Therefore, these compounds may affect the apparent anthocyanin equilibrium constants. Hence, apparent hydration and acidity constants were also evaluated in the *Hibiscus sabdariffa* extract by the pH-jump and MCR

method at 25°C. The former method gave: $K_a = 4.27 (\pm 0.39) \times 10^{-5}$, $K_h = 10.9 (\pm 0.63) \times 10^{-4}$. The latter only yielded $K_h = 1.91 \times 10^{-4}$. As the main anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* extract are Del-3Sb and Cya-3Sb¹, the UV-visible spectra gave just one absorption maximum at 522 nm, which is representative of the mixture. In the absence of strongly interacting species in the extract (copigments, metal ions), the apparent equilibrium constants are expected to be a weighted average of the two constants of the individual pigments, which is consistent with the values obtained. It is noteworthy that the spectra were contaminated in the UV domain by other compounds present in the extract, probably other phenols absorbing around 280 nm. Then, MCR-ALS was run on spectra recorded from 360 to 800 nm. The main conclusion from both methods is that the media does not substantially affect the equilibrium constants of the anthocyanins as the values obtained in the complex media were close to the values estimated for the pure pigments at 25°C. That means that the beverage does not contain molecules that substantially shift the equilibria by developing preferential interactions with some colored or colorless forms. In this case, the studies on individual anthocyanins can therefore be extrapolated to the natural extract.

4. Discussion

Determination of acidity and hydration thermodynamic constants of anthocyanins is usually performed by monitoring at a specific wavelength (520 nm) the apparent kinetics of the hydration reaction and subsequent mathematical treatments. At each step, error propagation must be significant but not evaluated. In comparison, the MCR method is an automatic procedure directly applied to raw data. Therefore error, which may arise from mathematical transformations and human intervention, is minimized even if the scientist's intervention is very important to control experimental data and choose the best mathematical treatment. The other interest of MCR is the consideration of all wavelengths and the possibility to obtain spectra of individual species from mixtures that are difficult to dissociate experimentally like the different anthocyanin forms in mildly acidic solution. However, the quality of results is very dependent on preliminary knowledge about the number and spectra of the species. The main drawback of MCR method is the lack of accuracy in the determination of absolute equilibrium constants. This problem arises when some molecules display

weak or poorly discriminating spectral characteristics. This is very much so with the hemiketal, which does not absorb in the visible range and only absorbs at 280 nm like any other phenol. To a lesser degree, this is also true for the quinonoid base, which is a transient species with visible absorption spread over two bands that are much weaker than the flavylum main visible band. This means that the quinonoid base and hemiketal were both underestimated, leading to overestimated pK_a and pK'_h values. In this work, we tried to improve the optimization by using a closure constraint to force the system to reach the same final sum of concentrations. However, the results (not shown here) were not significantly improved. To conclude, in term of methodology, the pH-jump method came up as the most robust and accurate one. However, MCR-ALS gave access to the normalized spectra of pure forms, which is crucial to accurately interpret color changes. In addition, the MCR-method could be used in the future to outline the evolution pattern of molecules that are hard to monitor by conventional protocols and/or hard to isolate such as polymers issued from anthocyanin degradation.

Annex: brief derivation of equation 4

Based on the structural transformations of anthocyanins (Fig. 1), only the flavylium ion and the hemiketal are connected through the hydration equilibrium. Hence, the apparent rate constant of water addition to the flavylium ion can be expressed as Pina (2014) ¹⁵:

$$k_h^{obs} = \chi_{AH^+} k_h + \chi_B k_{-h} [H^+] \quad (9)$$

Mole fraction of AH⁺ in fast acid-base equilibrium with A: $\chi_{AH^+} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a}$

Mole fraction of B in fast cycle-chain equilibrium with C_c: $\chi_B = \frac{1}{1 + K_t}$

Replacing the expression of the mole fractions into equation (9) and using $K_h = \frac{k_h}{k_{-h}}$

readily give:

$$\frac{[H^+] + K_a + K_h(1 + K_t)}{k_h^{obs}} = \frac{1 + K_t}{k_{-h}} + \frac{K_a(1 + K_t)}{k_{-h}} \frac{1}{[H^+]} \quad (10)$$

Assuming that C_t is a very minor species ($K_t \ll 1$), $K_h(1 + K_t)$ may be identified with K_h and equation (10) is thus equivalent to equation (4) used for the determination of pK_a.

Abbreviations

A: Quinonoid base

AH⁺: Flavylium cation

B: Hemiketal form

C_c: *cis*-chalcone

C_t: *trans*-chalcone

Cya-3Sb: Cyanidin-3-O-sambubioside

Del-3Sb: Delphinidin-3-O-sambubioside

K_a: Acidity constant

K'_h: Apparent hydration constant

k_h^{obs}: Apparent first-order rate constant of hydration

MCR-ALS: Multivariate Curve Resolution – Alternating least squares

References

- (1) Cisse, M.; Dornier, M.; Sakho, M.; Ndiaye, A.; Reynes, M.; Sock, O. Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations. *Fruits* **2009**, *64* (03), 179–193.
- (2) Cisse, M.; Vaillant, F.; Kane, A.; Ndiaye, O.; Dornier, M. Impact of the extraction procedure on the kinetics of anthocyanin and colour degradation of roselle extracts during storage. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92* (6), 1214–1221.
- (3) Pina, F.; Melo, M. J.; Laia, C. A.; Parola, A. J.; Lima, J. C. Chemistry and applications of flavylum compounds: a handful of colours. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (2), 869–908.
- (4) Hrazdina, G. Reactions of the anthocyanidin-3, 5-diglucosides: Formation of 3, 5-di-(O- β -d-glucosyl)-7-hydroxy coumarin. *Phytochemistry* **1971**, *10* (5), 1125–1130.
- (5) Sun, J.; Bai, W.; Zhang, Y.; Liao, X.; Hu, X. Identification of degradation pathways and products of cyanidin-3-sophoroside exposed to pulsed electric field. *Food Chem.* **2011**, *126* (3), 1203–1210.
- (6) Zhao, M.; Luo, Y.; Li, Y.; Liu, X.; Wu, J.; Liao, X.; Chen, F. The identification of degradation products and degradation pathway of malvidin-3-glucoside and malvidin-3,5-diglucoside under microwave treatment. *Food Chem.* **2013**, *141* (3), 3260–3267.
- (7) Sadilova, E.; Carle, R.; Stintzing, F. C. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51* (12), 1461–1471.
- (8) Brouillard, R.; Delaporte, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (26), 8461–8468.
- (9) Brouillard, R.; Dubois, J.-E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (5), 1359–1364.
- (10) Stintzing, F. C.; Stintzing, A. S.; Carle, R.; Frei, B.; Wrolstad, R. E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (21), 6172–6181.
- (11) Marco, P. H.; Poppi, R. J.; Scarminio, I. S.; Tauler, R. Investigation of the pH effect and UV radiation on kinetic degradation of anthocyanin mixtures extracted from *Hibiscus acetosella*. *Food Chem.* **2011**, *125* (3), 1020–1027.

- (12) Dangles, O.; Saito, N.; Brouillard, R. Kinetic and thermodynamic control of flavylum hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of *Pharbitis nil*. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (8), 3125–3132.
- (13) C. Ruckebusch; L. Blanchet. Multivariate curve resolution: A review of advanced and tailored applications and challenges. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *765*, 28–36.
- (14) Jaumot, J.; Gargallo, R.; de Juan, A.; Tauler, R. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**, *76* (1), 101–110.
- (15) Pina, F. Chemical applications of anthocyanins and related compounds. A source of bioinspiration. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (29), 6885–6897.
- (16) Fang, Z.; Zhang, M.; Sun, Y.; Sun, J. How to improve bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) juice color quality: effect of juice processing on bayberry anthocyanins and polyphenolics. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (1), 99–106.
- (17) Melo, M. J.; Moura, S.; Maestri, M.; Pina, F. Micelle effects on multistate/multifunctional systems based on photochromic flavylum compounds. The case of luteolinidin. *J. Mol. Struct.* **2002**, *612* (2–3), 245–253.
- (18) Rein, M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. **2005**.
- (19) Cabrita, L.; Fossen, T.; Andersen, Ø. M. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.* **2000**, *68* (1), 101–107.
- (20) Março, P. H.; Scarminio, I. S. Q-mode curve resolution of UV–vis spectra for structural transformation studies of anthocyanins in acidic solutions. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583* (1), 138–146.
- (21) Nave, F.; Petrov, V.; Pina, F.; Teixeira, N.; Mateus, N.; de Freitas, V. Thermodynamic and kinetic properties of a red wine pigment: catechin-(4, 8)-malvidin-3-O-glucoside. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (42), 13487–13496.
- (22) Dougall, D. K.; Baker, D. C. Effects of reaction mixture and other components on the determination of the equilibrium and rate constants of the hydration reactions of anthocyanins. *Food Chem.* **2008**, *107* (1), 473–482.

3^{ème} partie : Exploration of reaction mechanisms of anthocyanin degradation in a roselle extract through kinetic studies on formulated model media

André Mundombe Sinela¹, Christian Mertz², Nawel Achir^{3*}, Nadirah Rawat²,
Kevin Vidot², Hélène Fulcrand⁴ and Manuel Dornier³

¹Instituto Superior de Tecnologia Agro-alimentar de Malanje (ISTAM), EN 230 km 2, Malanje, Angola

²CIRAD, UMR95 QualiSud, 73 av. J.F Breton, TA B-95/16, F-34398 Montpellier cedex 5, France

³Montpellier SupAgro, UMR95 QualiSud, 1101 av. Agropolis, B.P. 5098, F-34093 Montpellier cedex 5, France

⁴INRA, UMR1083 SPO, 2 place Viala F-34060 Montpellier, France

*Corresponding author:

Dr. Nawel Achir

Montpellier Supagro, UMR 95 QUALISUD

1101, avenue Agropolis

34093 Montpellier Cedex 5

nawel.achir@supagro.fr

Phone +33/4 67 87 40 89

Publication 3 : soumise à Food Chemistry

Les résultats obtenus dans la 2^{ème} partie de ce chapitre ont montré que la constante d'hydratation de la delphinidine 3-O-sambubioside (Del-3Sb) est plus élevée que celle de la cyanidine 3-O-sambubioside (Cya-3Sb). Ainsi, à un pH donné, la forme hydratée (réputée plus instable que le cation flavylum) de la Del-3Sb est plus abondante que celle de la Cya-3Sb ce qui suggère que la dégradation thermique pourrait être liée à cette forme hydratée.

Dans la 3^{ème} partie de ce chapitre, présenté sous forme d'un article soumis à *Food Chemistry*, sont étudiés les effets des facteurs endogènes notamment la teneur en dioxygène dissous, la présence d'autres polyphénols (acides chlorogénique et gallique, phloroglucinaldéhyde) et celle de métaux (Fe, Cu, Mn) sur la dégradation des principales anthocyanes d'hibiscus. Les expériences sont menées dans un extrait aqueux dégazé ou non, une fraction polyphénolique isolée de l'extrait et dans des milieux modèles permettant de découpler l'impact des différents constituants de l'extrait sur les vitesses de dégradation des anthocyanes. Toutes les solutions sont stockées pendant 2 mois à 37 °C et les échantillons sont prélevés régulièrement. Les anthocyanes et leurs produits de dégradation sont analysés par HPLC-DAD. La concentration en oxygène dissous n'a pas eu d'incidence sur la vitesse de dégradation des anthocyanes. Par contre, la constante de vitesse de dégradation de la Del-3Sb est multipliée par 6 lorsque la concentration en Fe³⁺ augmente de 1 à 13 mg.L⁻¹. Elle diminue en présence de polyphénols (acides chlorogénique et gallique). Dans les mêmes conditions, la constante de vitesse de la Cya-3Sb n'est pas affectée par les polyphénols. Cependant, l'augmentation de la concentration en fer multiplie par 3 cette vitesse tout en diminuant le rendement de production du produit de scission principal, l'acide protocatéchique. Deux voies de dégradation des anthocyanes sont mises en évidence. La principale voie correspond à une oxydation catalysée par un métal suivie d'une condensation / polymérisation tandis que la scission, qui ne représente qu'environ 10% des anthocyanes dégradées, est la voie minoritaire.

Abstract

This study examines the effect of endogenous factors namely oxygen, polyphenols (chlorogenic, gallic acid and phloroglucinaldehyde) and metals (Fe, Cu, Mn) on degradation of delphinidin and cyanidin 3-O-sambubioside the main anthocyanins from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Experiments were conducted on an aqueous extract degassed or not, an isolated polyphenolic fraction and extract-like model formulated media allowing to decouple the impact of the different constituents on anthocyanin degradation rates. All solutions were stored during 2 months at 37°C and samples were regularly collected. Anthocyanin and their degradation compounds were analyzed by HPLC-DAD. Oxygen concentration did not impact substantially the degradation rate of anthocyanin. Degradation rate of delphinidin 3-O-sambubioside was increased till 6-fold when mixed with iron from 1 to 13 mg.kg⁻¹ while decreased by other polyphenols, chlorogenic and gallic acids. In the same conditions, degradation rate of cyanidin 3-O-sambubioside was not affected by polyphenols. However, increasing iron concentration increased this rate by 3-fold while decreasing the yield of production of the resulting scission product, protocatechuic acid. Two pathways of degradation of anthocyanins were identified. The major one was a metal-catalyzed oxidation followed by condensation / polymerization while the minority one, was scission which represents about 10% of degraded anthocyanins.

Keywords: cyanidin 3-O-sambubioside, delphinidin 3-O-sambubioside, *Hibiscus sabdariffa* L., metals, oxidation, polyphenols, scission.

1. Introduction

Calyces of roselle, a tropical annual crop belonging to the family *Malvaceae* (*Hibiscus Sabdariffa* L.), are traditionally used to prepare a bright red beverage by decoction in water. Its strong red coloration is due to the main anthocyanins present in the calyces: delphinidin-3-O-sambubioside and cyanidin-3-O-sambubioside (Cisse *et al.*, 2009a). Chemically, anthocyanins are glycosides of polyhydroxy and polymethoxy derivatives of flavylum salts. The intensity of the anthocyanin color is attributed to the resonant structure of the flavylum ion (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). Besides their vibrant colors, anthocyanins also have anti-oxidant and bioactive properties linked to certain health benefits *e.g.*, anti-diabetic, anti-inflammatory, and anti-cancer effects (Signorelli *et al.*, 2015).

Several studies regarding the storage stability of anthocyanin pigments have been conducted in model beverages and juice extracts. The storage temperature was found to be the main factor responsible for anthocyanin loss (Cisse *et al.*, 2009b; Jiménez *et al.*, 2010). The degradation rate is affected by several factors including pH, temperature, oxygen, metals ions, and other polyphenols (Benítez *et al.*, 2002; Bordenave *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2016). The knowledge of the influence of some of these endogenous factors may help to understand the mechanism involved in the degradation of anthocyanins from hibiscus. In previous studies, the effect of temperature on degradation of main anthocyanins from hibiscus was studied (Sinela *et al.*, 2017). However, complex composition of extract did not allow the factors that affect the rates of degradation of anthocyanins to be identified because it can be multiple. Working on extract and at the same time on model media could be a good alternative to decouple the effect of each constituent assumed to have an impact on anthocyanin degradation. This approach seemed to be a good compromise to conduct a kinetic study, simplifying the medium composition while enabling comparison with the initial matrix (Hadjal *et al.*, 2013).

In the current study the influence of oxygen, metals and polyphenols on degradation rate of hibiscus anthocyanins was investigated. The mechanism involved on degradation of these anthocyanins was also explored in the light of kinetic approach.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

Calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. used belonged to the variety Vimto, cultivated in the village of Thiaré, Senegal. Upon harvesting, the calyces were manually shelled and sun-dried on racks for 5 to 10 days.

2.2 Chemicals

Delphinidin 3-O sambubioside, cyanidin 3-O-sambubioside, 3-caffeoylquinic acid, protocatechuic acid, gallic acid and malic acid were obtained from Extrasynthèse (Genay, France). Iron chloride, copper chloride, manganese chloride, Amberlite XAD-16 resin were from Sigma Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). All solvents were of HPLC grade and purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Deionized water was produced by a Milli-Q unit (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.3 Preparation of the extract and polyphenolic fraction

Calyces were first ground with an electric grinder (Vorwerk Thermomix, France) and macerated in deionized water using a calyces/water ratio of 1/10 (w/w) for 30 min at 25°C. Manual agitation was carried out regularly. The mix was then filtered through a filter bag (10 x 38 cm, 25 µm mesh, Leentech, Belgium) to obtain the real extract. To evaluate the oxygen impact, this extract was deaerated by nitrogen stripping until the dissolved oxygen content decreased below 0.5 mg.L⁻¹.

For phenolic isolation, fractionation of the extract was carried out on a column (22 cm x 2.5 cm) filled with Amberlite XAD-16 resin (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau, France), previously conditioned with 4 equivalent volumes of solvated resin (bed volume BV) with methanol/water (80/20 v/v), 4 BV of methanol/water (20/80 v/v) and 4 BV of milli-Q water. After loading the extract (2 mL) on the resin, the column was washed with 4 BV of milli-Q water then eluted with 4 BV methanol/water (80/20 v/v) and finally with 4 BV of pure methanol at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. The eluted fractions were combined, evaporated to dryness under vacuum and then redissolved with 2 mL milli-Q water (equivalent volume of extract adsorbed on the resin). The obtained fraction was called the polyphenolic fraction (PF). Its pH was adjusted to the pH of the extract with a few drops of concentrated hydrochloric acid (12 M).

Real extract and polyphenolic fraction were finally placed in 15 mL amber vials that were hermetically sealed. All the vials were submitted to a pasteurization treatment

carried out by immersion in an oil bath under temperature control (84 °C / 2 min). The amber vials were then stored at 37°C for 60 days.

2.4 Preparation of model media

All media solutions were prepared in 0.1 M malic acid solution (pH = 2.2) whose compositions are shown in Table 20. All media solutions were stored in amber vials at 37°C for 60 days.

Table 20: Formulation of model media (concentrations in mg.L⁻¹).

Model media n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Compounds																					
Delphinidin 3-O-sambubioside	-	-	-	200	-	200	-	200	-	-	200	200	-	-	-	-	-	200	-	-	-
Gallic acid Protocatechuic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	200	-	200
Cyanidin 3-O-sambubioside	200	200	200	-	200	-	200	-	200	200	-	200	200	200	200	200	200	-	-	-	-
Phloroglucinaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caffeoyl-3-quinic acid	-	200	-	-	200	200	200	200	200	-	-	200	-	200	200	-	200	200	-	-	-
Fe³⁺ (FeCl₃ used)	-	-	13	13	1	1	7	13	13	13	13	13	-	-	1	1	1	1	13	13	13
Cu²⁺ (CuCl₂ used)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	0.3	0.3	0.3	-	-	-
Mn²⁺ (MnCl₂ used)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	20	-	20	20	20	-	-	-

2.5 Analyses

Dosage method of metals present in the extract and polyphenolic fraction was adapted from NF EN ISO 11885. Samples were analyzed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) (VARIAN VISTA, Victoria, Australia), equipped with a Coupled Charged Device detector.

Phenolics were analyzed by HPLC-DAD. All the samples (20 μL injection volume) were filtered before (Millipore, 0.45 μm) and then analyzed on an HPLC DIONEX ULTIMATE 3000 equipped with a diode array detector and an autosampler. A reversed phase ACE C18 column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , AIT, France) thermostated at 30 $^{\circ}\text{C}$ was used for the separation. The mobile phase was constituted of water/formic acid/acetonitrile (97.2/2/0.8 v/v/v) as solvent A and acetonitrile as solvent B at a flow rate of 0.7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ with a linear gradient from 5 to 25% of solvent B in 50 min and then to 100% of solvent B in 2 min. Eluted compounds were detected at 280, 330, 360 and 520 nm. Concentrations were determined using a calibration curve of corresponding standards and the measurement was carried out in triplicate.

2.6 Kinetic modeling of anthocyanin degradation

Degradation of both anthocyanins was found to follow a first order reaction kinetic (Sinela *et al.*, 2017). So at constant temperature, anthocyanin concentration A decrease according to equation 1.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-kt} \quad (1)$$

where A_0 anthocyanin concentration at $t = 0$, t the time (s) and k the observable degradation rate (s^{-1}).

Considering i different parallel reaction pathways all irreversible and of first order with a reaction rate k_i , the concentrations of the different degradation products P_i increase according to equation 2.

$$P_i = A_0 \frac{k_i}{k} (1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

With $k = \sum k_i$

We assume an initial concentration $P_0 = 0$ at time $t = 0$.

The reaction rates were identified by nonlinear regression with a least square minimization procedure using the complement Excel "Solver". This procedure allows a more accurate identification of constants compared to the usual logarithm linearization (Van Boekel, 2009). Uncertainty of the rate constants was obtained by the VBE Macro "SolverAid" (de Levie, 2012).

Conversion rate τ was used for quantifying the anthocyanin degradation progress (equation 3).

$$\tau = 1 - \frac{A}{A_0} \quad (3)$$

3. Results and discussions

3.1 Compositions

Main anthocyanins, chlorogenic acid, metals, pH and total solid soluble (TSS) of *Hibiscus sabdariffa* extract on dry weight bases are shown in Table 21. Among different metals, potentials catalyzers of non-enzymatic oxidation reaction of anthocyanins can be found in the extract. It is the case for Cu, Fe and Mn. Mn is present at the highest concentration of 20 mg.kg⁻¹.

Polyphenolic fraction (PF) obtained by desorption in resin was interesting to exclude interferences of sugars, aliphatic carboxylic acids, and part of the metals present in the extract on anthocyanin degradation (Table 21). Its initial pH is low, 3.3, probably due to the presence of phenolic acids such as 2-, 4-, and 5-caffeoylquinic acid, that has low pKa of about 2.7 (Tehan *et al.*, 2002). According to TSS, sugars were widely removed in the PF. Metal ion concentrations were drastically decreased except for Cu that was not really affected. As expected, phenolic composition of the PF is close to those of the extract.

Table 21: Chemical composition of the extract and polyphenolic fraction from *Hibiscus sabdariffa*.

Polyphenols (mg.kg ⁻¹)				Metals-trace elements (mg.kg ⁻¹)								pH	TSS (g.kg ⁻¹)
	Cyanidin 3-O-sambubioside	Delphinidin 3-O-sambubioside	Chlorogenic acid	P	K	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn		
Extract	460 (27)	780 (46)	819 (2)	50	1080	300	160	0.3	1.0	20	1.3	2.18	58
Polyphenolic fraction	300 (18)	440 (26)	791 (11)	<10	20	10	<10	0.2	0.3	0.0	0.3	3.30*	9

* before acidification at pH 2.2

3.2 Comparison of stability of anthocyanins in extract and polyphenolic fraction

This study demonstrated that anthocyanin stability greatly depended on the matrix (extract and polyphenolic fraction). Cya-3Sb was less stable in extract than in polyphenolic fraction with k values of $0.840 (0.020) 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ and $0.500 (0.012) 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ respectively whereas Del-3Sb values were $1.007 (0.051) 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ and $0.590 (0.014) 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ respectively. These results showed that anthocyanins degraded about 2 times slower in polyphenolic fraction than in extract. Difference between extract and PF is their content in polar organic solutes (e.g. sugars, carboxylic acids, etc.) and metals. These metals are known to be involved on condensation/polymerization reactions of anthocyanins (Cacho *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 2009; Fulcrand *et al.*, 1996).

Among the different factors known to affect degradation of anthocyanins, we focused on oxygen, metals, phenolic acids and aldehydes because there is no information about their effects on degradation kinetics of anthocyanins from roselle to gain insight degradation mechanisms. For this reason, investigations of the interdependencies between plant matrix compounds and anthocyanins stability are made in model media to clarify the impact of these compounds present in the extract and its possible interaction with the others.

3.3 Effect of dissolved oxygen

In the extract, rate constant of Cya-3Sb degradation was $1.10 (0.30) 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ and $0.84 (0.02) 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ with oxygen concentrations at 0.5 and 5.6 mg. L⁻¹ respectively. For del-3Sb, the rates were $1.24 (0.20) 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ and $1.01 (0.05) 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. These findings indicate that concentration of oxygen does not influence significantly the degradation of main anthocyanins of roselle. Our results are in agreement with Danilewicz (2003) who concluded that the direct interaction of phenolics and oxygen does not occur. Reactivity of oxygen with the biomolecules is restricted by the presence of two unpaired electrons in the antibonding orbital π^* which have parallel spins (Ribeiro *et al.*, 2006). Indeed, reactivity take place when triplet oxygen (O_2) is converted to reactive oxygen species such as superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and its conjugate acid hydroperoxyl (HOO^{\cdot}), hydroxyl (HO^{\cdot}), peroxy (ROO^{\cdot}) and alkoxy (RO^{\cdot}) which are radicals with paired electrons. This conversion is likely catalyzed by transition metals

such as Fe (Oliveira *et al.*, 2011; Waterhouse and Laurie, 2006). These radicals are likely not produced in the extract not degassed, becoming unreactive oxygen with anthocyanins.

3.4 Effect of constituents of extract studied in model media

Degradation rate constants of Del-3Sb and Cya-3Sb, obtained in different models media are given in Table 22.

Table 22: Degradation rate constant $k \times 10^{-6} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ of anthocyanins in different model media.

	Cya-3Sb	Del-3Sb
In solution models:		
co reactants:		
None	0.084 (0.003) ^j	-
CA	0.098 (0.003) ^j	-
Fe 13ppm	0.250 (0.015) ^f	1.853 (0.036) ^a
CA+Fe 1ppm	0.123 (0.007) ⁱ	0.320 (0.006) ^g
CA+Fe 7ppm	0.190 (0.008) ^g	-
CA+Fe 13ppm	0.427 (0.017) ^c	0.987 (0.017) ^e
Phloro+Fe 13ppm	0.377 (0.021) ^d	-
GA+Fe 13ppm	-	1.190 (0.025) ^b
D+CA+Fe 13ppm	0.437 (0.005) ^c	-
C+CA+Fe 13ppm	-	1.067 (0.026) ^c
Mn 20ppm	0.091 (0.002) ^j	-
CA+Mn 20ppm	0.096 (0.003) ^j	-
CA+Fe 1ppm+Cu 0.3ppm	0.157 (0.003) ^h	-
Fe 1ppm+ Cu 0.3ppm+Mn 20ppm	0.293 (0.004) ^e	-
CA+Fe 1ppm+ Cu 0.3ppm+Mn 20ppm	0.320 (0.009) ^k	1.180 (0.048) ^b

Values are the means of three determinations with standard deviations in parentheses. Different small letters in the same column refer to significantly different data ($p < 0.05$). CA= chlorogenic acid; GA= galic acid

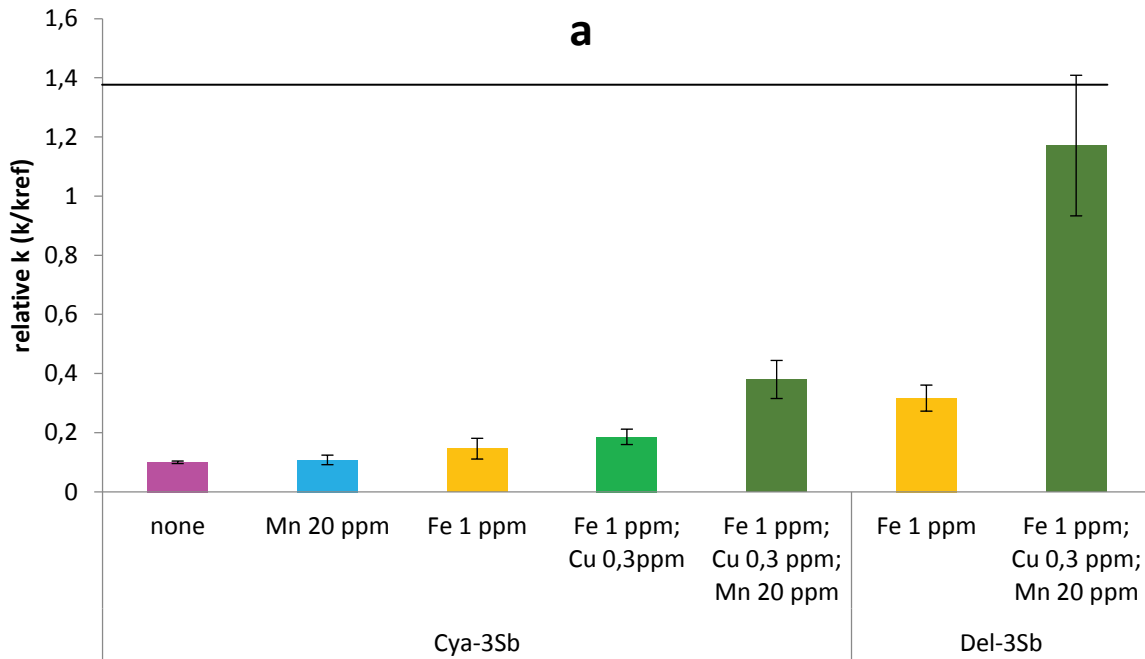
Phloro= Phloroglucinaldehyde; C= cyanidin 3-O-sambubioside; D= delphinidin 3-O-sambubioside.

In general, the *o*-di-hydroxy-phenyl pattern of cyanidin degraded slower than the *o*-tri-hydroxy-phenyl pattern of delphinidin. The k for each model solution differed significantly from the rate obtained in the extract. Indeed, as a function of the

experiments, k could be multiplied by up to 10 times. Therefore, to simplify the comments for all conditions, all rates were normalized with the k obtained in the extract which is used as a reference (k_{ref}) in Figure 27 and 28.

3.4.1 Effect of metals

Effect of Fe, Cu and Mn on anthocyanins degradation, in similar concentration than extract (1, 0.3 and 20 mg.kg⁻¹ respectively), are shown in Figure 27a.



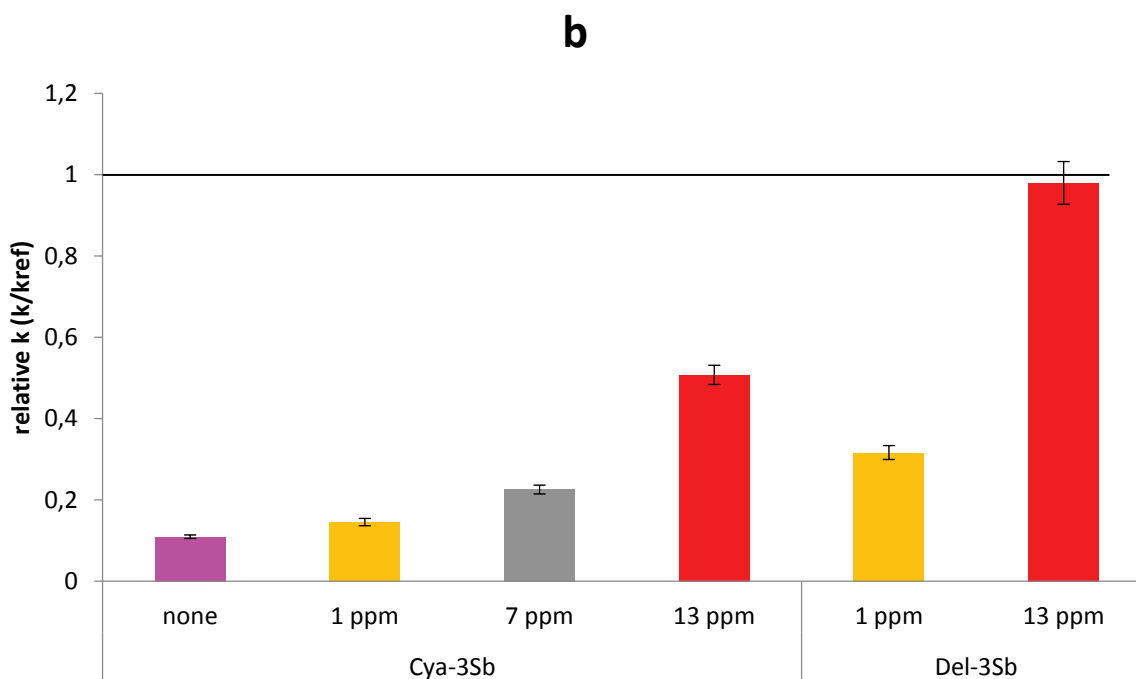


Figure 27: Effect of metals (a) and Fe III concentration (b) on the degradation of and cyanidin 3-O-sambubioside and delphinidin 3-O-sambubioside in model media.

Manganese did not affect significantly the degradation of Cya-3Sb. Activity of manganese oxides is pH- and reduction potential-dependent (Ukrainczyk and McBride, 1992). Those authors previously reported that at pH below 4 phenol is oxidized irreversibly by manganese oxides. These results are not consistent with ours and the difference could be due to the form of manganese used (manganese chloride in our case).

Despite the transition metals are known as catalysers of non-enzymic browning reaction, Benítez *et al.*, (2002) did not observed effects of manganese on sherry wine browning at lower concentrations than ours, ranging from 0.8 to 1.6 mg.L⁻¹. They also observed that when the concentration of iron increased, at concentrations of manganese equal or superior to 0.8 mg.L⁻¹, there was a strong increase in the tendency to browning. This could be evidenced that, in order for iron to act as a catalyzer of the phenomenon of browning, the presence of manganese was needed and *vice-versa*. The possible synergy may come from the variation of the redox potential of the solution or the interaction between metals.

Cyanidin 3-O-sambubioside degraded 2-fold faster when Fe and Cu were added in comparison with Fe only. Again, these results showed the possible synergic relationship that could result from the coexistence of these metals. Ferric and cupric cations are also believed to play an important role as catalysts by forming intermediate oxidation products (Scollary, 1997).

It is noteworthy that degradation of Cya-3Sb in the extract cannot only be explained by the presence of Fe, Cu and Mn. Indeed, the rate obtained with these metals was still 40% lesser than that found in the extract.

Combination of Fe, Cu and Mn showed higher incidence on the degradation of Del-3Sb. Indeed, with all metals, the degradation rate for this anthocyanin was close to that found in the extract. That means that the presence of the three metals may explain the degradation of Del-3Sb in the extract of *Hibiscus*. Multivalent metals, such as Fe, Cu, and Mn, in beverages derived from grapes, have been shown to be catalysts in the oxidation process (Cacho *et al.*, 1995).

3.4.2 Effect of iron concentration

Iron concentration affects the degradation of both anthocyanins (Figure 27b). An increase of 1 to 13 mg.L⁻¹ of iron led to a degradation rate increase of about 3-fold for both anthocyanin. Presence of high amount of iron (1-10 mg.L⁻¹) also induced cyanidin 3-sophorosid degradation (Iontschewa and Tantshev, 1979). The effect of iron was also studied on the production of scission products already identified in *Hibiscus sabdariffa* extract (Vimto variety) (Sinela *et al.*, 2017). Measurement of the protocatechuic acid formation at variable concentration of iron allowed, from the constant of overall degradation of Cya-3Sb in the model media, to determine the rate constant of scission reaction (assimilated to the constant rate of formation of protocatechuic acid). Considering two Cya-3Sb degradation pathways, i.e. scission and another, apparent rate constants k_1 and k_2 were calculated from equation 2 (Table 23).

Table 23: Rate constants $k \times 10^{-6}$ (s^{-1}) of overall degradation of cyaniding 3-O-sambubioside, scission k_1 and other pathways k_2 in model media at different iron concentrations.

Fe (mg.L ⁻¹)	k	k ₁	k ₂
0	0.098	0.006	0.092
1	0.123	0.006	0.117
7	0.190	0.008	0.182
13	0.427	0.014	0.413

The values obtained showed that the degradation by scission pathway is minor compared to the overall degradation. Indeed, for the range of iron concentration studied, the constant degradation rate is from 16 to 33 times greater than the scission rate constant.

Mechanism of anthocyanin degradation by scission was previously studied and it was known as activated by temperature (Markakis and Jurd, 1974; Sun *et al.*, 2011). The degradation mechanism was adapted on Del-3Sb and Cya-3Sb from *Hibiscus sabdariffa* Vimto variety (Sinela *et al.*, 2017). The reactions involve hydrolysis of glycosidic bonds as a first step, forming aglycone which is more unstable than its glycosides. Aglycon would then be cleaved to degrade into phenolic acid and phenolic aldehyde (Hrazdina and Borzell, 1971).

Low production of about 10% (in mol) of protocatechuic and gallic acids, after 100% anthocyanin degradation was obtained over 60 days. Despite many studies have shown instability of protocatechuic and gallic acids, molecules bearing catechol or galloyl groups respectively (electron-donating abilities) (Andjelković *et al.*, 2006), we found that these compounds were stable in the presence of Fe (13 mg.L⁻¹), with degradation rate constants being 19 and 36-fold lesser than their corresponding anthocyanins respectively. It can suggest other(s) pathway(s) to explain anthocyanin degradation in the extract of hibiscus. Oxidation catalyzed by the metals can be the origin of the other pathway.

Evolution of the molar yield of scission products (gallic acid and protocatechuic acid) as a function of conversion rate of its corresponding anthocyanins (Del-3Sb and Cya-3Sb respectively) are shown in Figure 28.

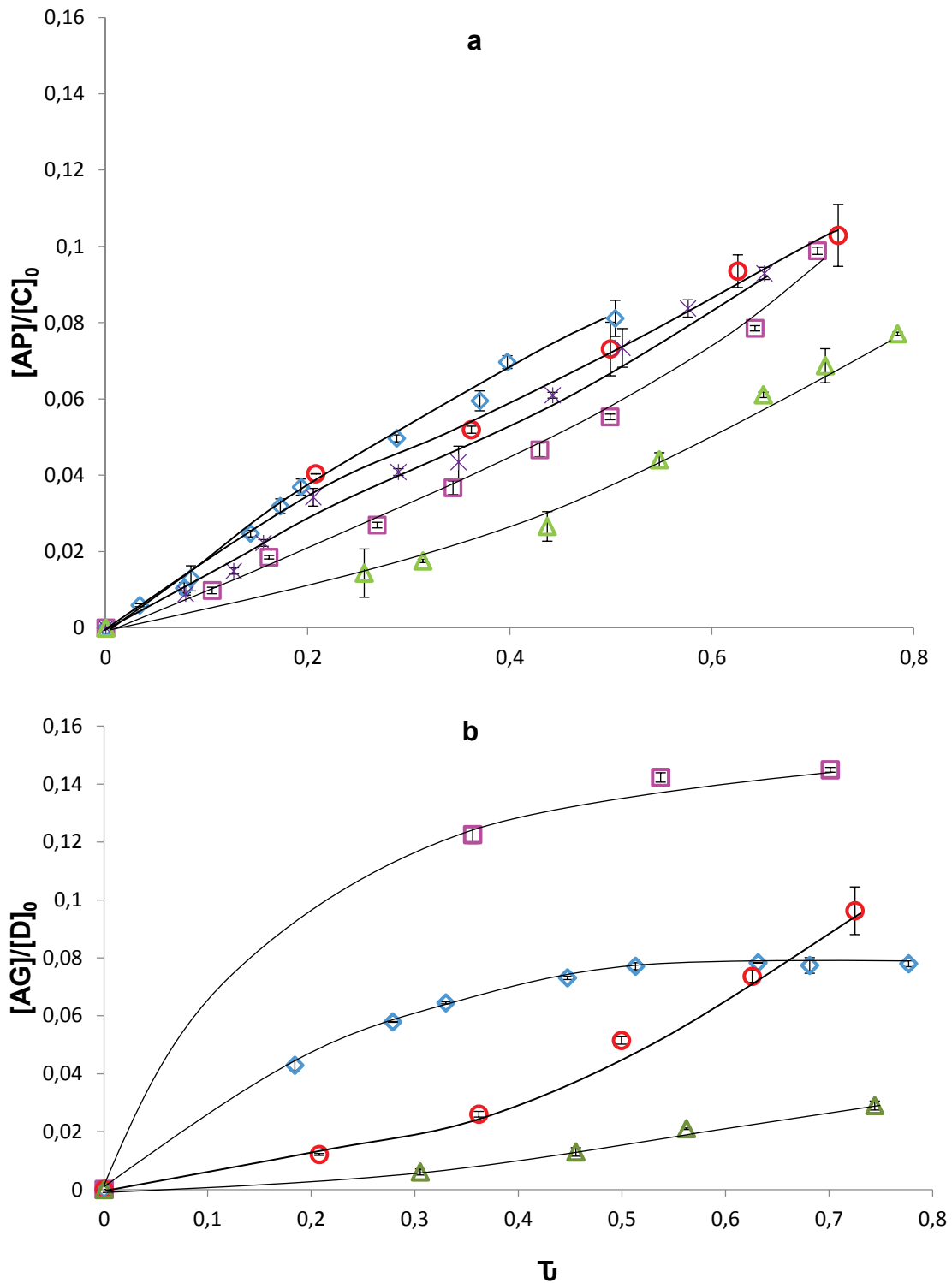


Figure 28: Molar fraction of scission products as a function of conversion rate (τ) in model media. Protocatechiuc acid vs. cyanidin 3-O-sambubioside C (a) and gallic acid vs. delphinidin 3-O-sambubioside D (b). \diamond (C or D+CA+Fe 1mg.kg⁻¹), \times (C+CA+Fe 7mg.kg⁻¹), Δ (C or D +CA+Fe 13mg.kg⁻¹), \square (C or D +CA+Fe 1mg.kg⁻¹+ Cu 0.3 mg.kg⁻¹+ Mn 20 mg.kg⁻¹) and \circ (C or D in extract).

When concentration of Fe increased from 1 to 13 mg.kg⁻¹ there was a decrease in molar yield of scission product for the same conversion rate of anthocyanins. For example at a conversion rate of 50%, there was a decrease in molar yield of gallic acid of about 3-fold (Figure 28a). With the same conversion rate, molar yield of protocatechuic acid decreased about 2-fold (Figure 28b). It means that the scission pathway has not been enhanced by an increase of the Fe concentration.

3.4.3 Effect of polyphenols

Chlorogenic acid is one of the major polyphenol compounds found in roselle and its effect on anthocyanin degradation is shown on Figure 29.

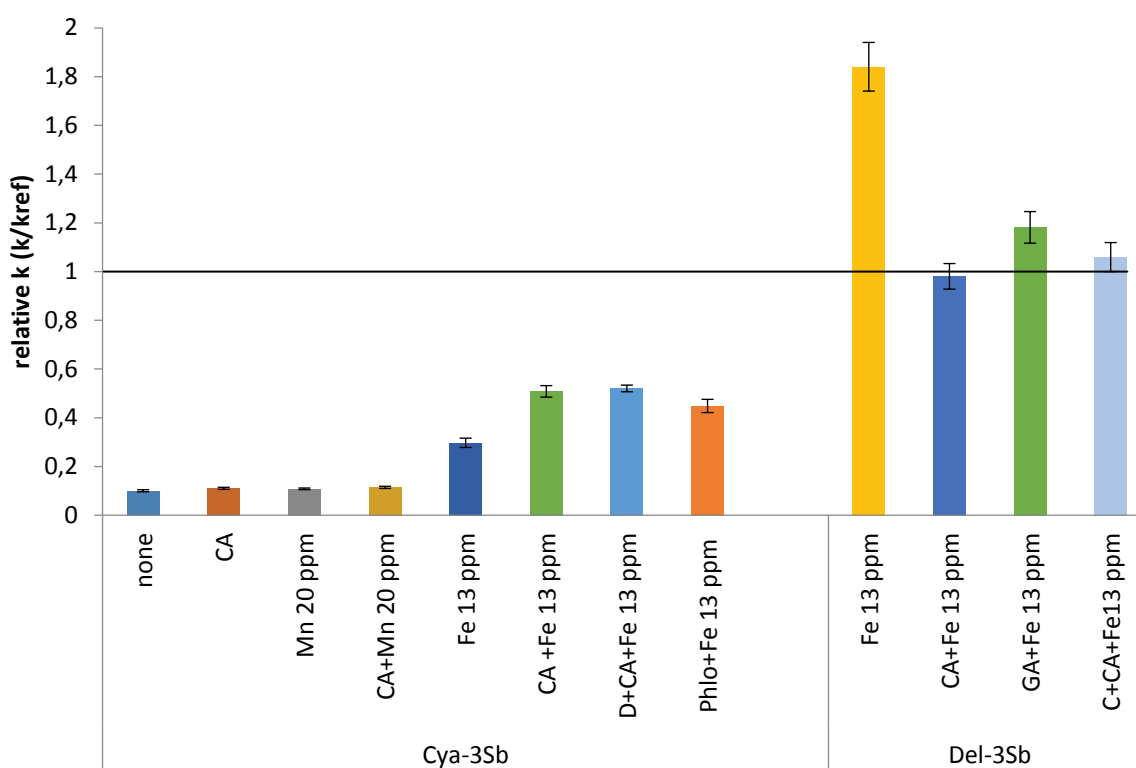


Figure 29: Effect of polyphenolics compounds on the degradation of cyanidin 3-O-sambubioside and delphinidin 3-O-sambubioside.

It did not influence degradation of Cya-3Sb even mixed with Mn. However, when mixed with Fe, degradation rate of Cya-3Sb increase by a 42%. Therefore, the explanation of the degradation increase may remain on an indirect relation between chlorogenic acid and anthocyanin. Indeed, the mixture of chlorogenic acid with iron could have generated quinone that could be attacked by anthocyanins (hydrated form). Non-enzymic reactions could then convert half of the quinone into

hydroxyquinone and regenerate chlorogenic acid from the rest, and polymerization of the hydroxyquinone would produce the brown end products (Pierpoint, 1966). In our study the regeneration of a half of the quinone into chlorogenic acid can be explained by the remaining 65% of chlorogenic acid after 60 days of storage at 37 °C.

A different behavior was observed for Del-3Sb that seemed protected by chlorogenic acid in presence of Fe because k reduced by 47% and 36% after adding chlorogenic and gallic acid respectively. This is in accordance with Kopjar *et al.* (2009) who showed that phenolic compounds prevented thermal degradation of total anthocyanins from red currant juice (delphinidin 3-rutinoside being the most abundant anthocyanin). Indeed, adding chlorogenic acid and gallic acid (molar ratio phenolic compound / anthocyanin 50/1) reduced anthocyanins degradation by 42% after heating 1h at 30°C (Kopjar *et al.*, 2009). Implementation of phenolic compounds in the presence of anthocyanins have been suggested as an association reactions such as intermolecular copigmentation, which are known to reduce losses during storage of anthocyanins (Cavalcanti *et al.*, 2011). In our study, the protective effect of chlorogenic acid on Del-3Sb, could not be attributed to a copigmentation phenomenon because it was not observed. The copigmentation effect is evident under weakly acid conditions (pH 3–4) where anthocyanins exist in its colourless forms (Brouillard *et al.*, 2010). Copigmentation is also dependent on molar ratio, the anthocyanin/copigment molar ratio of 1:100 resulted in the strongest copigmentation effect (Eiro and Heinonen, 2002), it is not our case.

Anthocyanins degradation mediated by aldehydes as well as their derivatives is well known (Dallas *et al.*, 1996; Debick-Pospsil *et al.*, 1983). For this reason we tested effect of phloroglucinaldehyde and it influenced on degradation of Cya-3Sb (Figure 29).

The effect of scission product on degradation of anthocyanins as well as potential interaction between both anthocyanins was also tested (Figure 29). Depending on phenolic compound, degradation of anthocyanins was prevented or enhanced in higher or lesser extent. Gallic acid prevented degradation of Del-3Sb. Neither Del-3Sb, nor Cya-3Sb influenced degradation of the other anthocyanin.

Kinetic studies on model media with polyphenols can explain that degradation of Cya-3Sb in polyphenolic fraction was not linked directly to chlorogenic acid. The trace of iron on this fraction might promote degradation by mechanism involving a reaction

between chlorogenoquinone and/or secondary products of oxidation formed from the quinone and pigment. For Del-3Sb the trace of metals could have attacked the anthocyanin as it happened more strongly in model media with metals and extract.

3.5 Mechanism of degradation of anthocyanins

From the last findings, the main pathways of the degradation of anthocyanin from hibiscus can be mapped out (Figure 30).

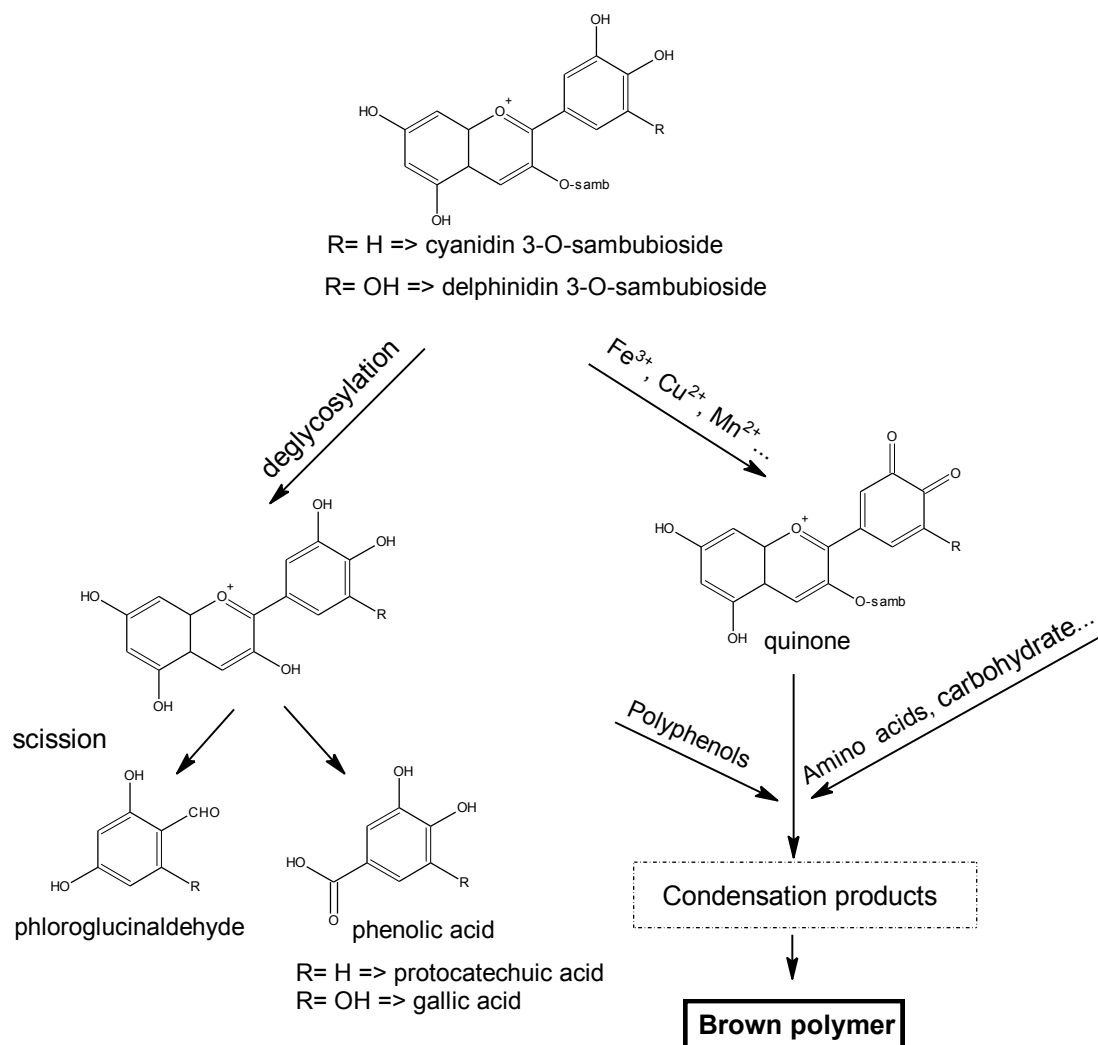


Figure 30: Mechanism of degradation of cyanidin 3-O-sambubioside and delphinidin 3-O-sambubioside by scission and oxidation.

Rate conversion allowed an approximate quantification of scission pathway of degradation of anthocyanins and checked how the metals (Fe, Cu and Mn) and concentration in Fe could interfere in this pathway. It is important to note that the stability of these degradation products was studied in presence of Fe at 13 mg.kg⁻¹. Protocatechuic acid and gallic acid were stable with low k values of 0.013 (0.001) 10⁻⁶ s⁻¹ and 0.051(0.002) 10⁻⁶ s⁻¹ respectively. It represented only 2 and 5% respectively of k values of its corresponding anthocyanin. Model media helped us to confirm that the scission products does not intervene in the degradation of anthocyanin. In the extract of roselle this pathway was marginal because it represented only about 10%.

At a conversion rate of 50%, combination of metals increased the molar yield of gallic acid 1.6-fold for Del-3Sb (figure 28b) contrary to Cya-3Sb where there was a decrease in molar yield of protocatechuic acid by 2-fold (figure 28a). Increase of iron from 1 to 13 mg.L⁻¹ reduced the scission pathway of degradation of both anthocyanins studied.

The second predominant degradation pathway of anthocyanin in the extract was polymerization. Usually this pathway is catalyzed by metals. Presence of metals in model media confirmed this kind of degradation in the extract of roselle.

Anthocyanins are supposed to be sequentially oxidized to semiquinone radicals and quinones while oxygen is reduced to hydrogen peroxide, and the whole process is mediated by the redox cycle of Fe³⁺/Fe²⁺, Cu²⁺/Cu⁺ and Mn²⁺/Mn⁺ (Elias *et al.*, 2009). Quinones formed from the oxidation of polyphenols as the primary products, are unstable and may undergo further reactions. Quinones can spontaneously combine with nucleophilic compounds (including some carbohydrates, amino acids, phenols, etc.) due to their high electrophilic character (Li *et al.*, 2008). This combination can produce dimers or polymers that have lower redox potentials than their initial phenols and are much more easily oxidized. Consequently, it is proposed that oxidation of these products results in an acceleration of the polymerization process (Li *et al.*, 2008).

Faster thermal degradation of delphinidin as compared to cyanidin might be related to an increasing of susceptibility to oxidation with increasing number of hydroxyl functions at the B ring (Hrazdina *et al.*, 1970). Such oxidative degradation of the

phenolic B ring might be the predominant degradation reaction at elevated temperatures (more than 20°C), being only of marginal importance at lower temperatures (4 and 20 °C) (Hrazdina *et al.*, 1970). In a previous paper, we established that hydration constant (hydration equilibrium) of del-3Sb was higher than that of cya-3Sb (Vidot *et al.*, 2016). Thus, at a given pH, the hydrated form (known to be more unstable than the flavylum cation) of del-3Sb is more abundant than the corresponding one for cya-3Sb and suggests that the thermal degradation is related to this hydrated form.

References

- Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M. & Verhe, R. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*, 98(1), 23-31.
- Benítez, P., Castro, R., Jose Antonio Sanchez, P. & Barroso, C. G. (2002). Influence of metallic content of fino sherry wine on its susceptibility to browning. *Food Research International*, 35(8), 785-791.
- Bordenave, N., Hamaker, B. R. & Ferruzzi, M. G. (2014). Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods. *Food & function*, 5(1), 18-34.
- Brouillard, R., Chassaing, S., Isorez, G., Kueny-Stotz, M. & Figueiredo, P. (2010). The visible flavonoids or anthocyanins: from research to applications.
- Cacho, J., Castells, J. E., Esteban, A., Laguna, B. & Sagristá, N. (1995). Iron, copper, and manganese influence on wine oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(3), 380-384.
- Cao, S., Liu, L., Lu, Q., Xu, Y., Pan, S. & Wang, K. (2009). Integrated effects of ascorbic acid, flavonoids and sugars on thermal degradation of anthocyanins in blood orange juice. *European Food Research and Technology*, 228(6), 975-983.
- Castaneda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A. & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T. & Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Research International*, 44(2), 499-509.
- Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W. & McClements, D. J. (2016). Stabilization of Natural Colors and Nutraceuticals: Inhibition of Anthocyanin Degradation in Model Beverages using Polyphenols. *Food Chemistry*.
- Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., Ndiaye, A., Reynes, M. & Sock, O. (2009a). Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations. *Fruits*, 64(03), 179-193.
- Cisse, M., Vaillant, F., Acosta, O., Dhuique-Mayer, C. & Dornier, M. (2009b). Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry, and

- roselle using the Arrhenius, Eyring, and Ball models. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(14), 6285-6291.
- Dallas, C., Ricada-da-Silva, J. & Laureano, O. (1996). Products formed in model wine solution involving anthocyanins, procyanidin B2, and acetaldehyde. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(8), 2402-2407.
- Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(2), 73-85.
- de Levie, R. (2012). *Advanced Excel for Scientific Data Analysis* (3 ed.). Brunswick, Maine USA: Atlantic Academic LLC.
- Debick-Pospsil, J., Lovric, T., Trinajstic, N. & Sabjic, A. (1983). Anthocyanin Degradation in the Presence of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural. *Journal of food science*, 48(2), 411-416.
- Eiro, M. J. & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(25), 7461-7466.
- Elias, R. J., Andersen, M. L., Skibsted, L. H. & Waterhouse, A. L. (2009). Key factors affecting radical formation in wine studied by spin trapping and EPR spectroscopy. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(4), 471-476.
- Fulcrand, H., dos Santos, P.-J. C., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. & Favre-Bonvin, J. (1996). Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*(7), 735-739.
- Hadjal, T., Dhuique-Mayer, C., Madani, K., Dornier, M. & Achir, N. (2013). Thermal degradation kinetics of xanthophylls from blood orange in model and real food systems. *Food Chemistry*, 138(4), 2442-2450.
- Hrazdina, G. & Borzell, A. (1971). Xanthylum derivatives in grape extracts. *Phytochemistry*, 10(9), 2211-2213.
- Hrazdina, G., Borzell, A. & Robinson, W. (1970). Studies on the Stability of the Anthocyanidin-3, 5-Digucosides. *American Journal of Enology and Viticulture*, 21(4), 201-204.
- Iontschewa, N. & Tantshev, S. (1979). Beeinflussung der Kinetik der thermischen Degradation von Cyanidin-3-Sophorosid durch Metallionen. *Food/Nahrung*, 23(6), 575-580.

- Jiménez, N., Bohuon, P., Lima, J., Dornier, M., Vaillant, F. & Pérez, A. M. (2010). Kinetics of anthocyanin degradation and browning in reconstituted blackberry juice treated at high temperatures (100– 180 C). *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(4), 2314-2322.
- Kopjar, M., Piližota, V., Šubarić, D. & Babić, J. (2009). Prevention of thermal degradation of red currant juice anthocyanins by phenolic compounds addition. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1(1), 24-30.
- Li, H., Guo, A. & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108(1), 1-13.
- Markakis, P. & Jurd, L. (1974). Anthocyanins and their stability in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 4(4), 437-456.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V. & Silva, A. M. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115-1126.
- Pierpoint, W. (1966). The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochemical Journal*, 98(2), 567.
- Ribeiro, S. M. R., de Queiroz, J. H., Peluzio, M. d. C. G., Costa, N. M. B., da Matta, S. L. P. & de Queiroz, M. E. L. R. (2006). A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience journal*, 21(3).
- Scollary, G. (1997). Metals in wine: contamination, spoilage and toxicity: Dossier: in vino analytica scientia. *Analusis*, 25(3), M26-M30.
- Signorelli, P., Fabiani, C., Brizzolari, A., Paroni, R., Casas, J., Fabriàs, G., Rossi, D., Ghidoni, R. & Caretti, A. (2015). Natural grape extracts regulate colon cancer cells malignancy. *Nutrition and cancer*, 67(3), 494-503.
- Sinela, A., Rawat, N., Mertz, C., Achir, N., Fulcrand, H. & Dornier, M. (2017). Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products. *Food Chemistry*, 214, 234-241.
- Sun, J., Bai, W., Zhang, Y., Liao, X. & Hu, X. (2011). Identification of degradation pathways and products of cyanidin-3-sophoroside exposed to pulsed electric field. *Food Chemistry*, 126(3), 1203-1210.
- Tehan, B. G., Lloyd, E. J., Wong, M. G., Pitt, W. R., Montana, J. G., Manallack, D. T. & Gancia, E. (2002). Estimation of pKa Using Semiempirical Molecular Orbital Methods. Part 1: Application to Phenols and Carboxylic Acids. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 21(5), 457-472.

- Ukrainczyk, L. & McBride, M. B. (1992). Oxidation of phenol in acidic aqueous suspensions of manganese oxides. *Clay Clay Miner*, 40(2), 157-166.
- Van Boekel, M. A. J. S. (2009). *Kinetic Modeling of Reactions in Foods*. Broken Sound Pkwy NW, Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group, LLC.
- Vidot, K., Achir, N., Mertz, C., Sinela, A. M., Rawat, N., Prades, A., Dangles, O., Fulcrand, H. & Dornier, M. (2016). Effect of temperature on acidity and hydration equilibrium constants of delphinidin-3-O- and cyanidin-3-O-sambubioside calculated from uni- and multi-wavelength spectroscopic data. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64, 4139–4145.
- Waterhouse, A. L. & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 306-313.

CHAPITRE IV :
Synthèse des résultats et discussion

La démarche expérimentale exposée dans ce travail a pour objectif d'apporter des éléments de compréhension de la dégradation des anthocyanes dans une boisson : l'extrait d'*Hibiscus sabdariffa* de variété Vimto préparée par décoction des calices de la plante dans l'eau. La méthodologie adoptée a consisté à caractériser la composition chimique de l'extrait d'hibiscus afin d'identifier et quantifier les molécules pouvant être impliquées, d'après la littérature, dans la dégradation des anthocyanes. Des premiers traitements thermiques et un stockage ont été mis en place afin d'évaluer l'importance de la dégradation des anthocyanes majoritaires par calcul de paramètres cinétiques et thermodynamiques. Ces essais ont également permis une première appréhension des produits de dégradation et de leur dynamique de production. Par la suite, des études plus approfondies en milieux modèles formulés avec les différents constituants impactants identifiés dans l'extrait ont été menées pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la dégradation des anthocyanes.

1. Caractérisation physico-chimique de l'extrait d'hibiscus

La caractérisation exhaustive des polyphénols a permis l'identification des anthocyanes majoritaires, à savoir la delphinidine 3-O-sambubioside et la cyanidine 3-O-sambubioside. Ces deux molécules représentent environ 50% en masse des composés polyphénoliques majoritaires de l'extrait, le reste étant constitué majoritairement d'acides caféoylquiniques (**publication 1**). Les sucres totaux évalués au travers de l'Extrait Sec Soluble (ESS) ainsi que l'acide malique (acide organique majoritaire) sont également présents dans l'extrait (Tableau 21, **publication 3** et annexe A). Les sucres sont susceptibles d'intervenir dans des réactions de Maillard et l'acide malique peut chélater des métaux. Enfin, l'analyse des minéraux a montré la présence de métaux, Fe, Cu et Mn, qui sont potentiellement impliqués dans des réactions d'oxydation (**publication 3**).

Cette composition met en évidence la variété des molécules pouvant avoir un impact sur la stabilité des anthocyanes. La complexité de la matrice rend très difficile la compréhension fine des mécanismes majoritaires de dégradation des anthocyanes d'hibiscus. Pour permettre l'approche mécanistique de la dégradation des anthocyanes, la simplification du milieu via des solutions modèles est indispensable. Toutefois, avant cela, une étude cinétique préalable sur l'extrait est réalisée afin de

quantifier l'effet de la température de stockage sur la dégradation des anthocyanes majoritaires d'hibiscus et d'identifier des produits de dégradation (**publication 1**).

2. Etude cinétique de la dégradation des anthocyanes dans l'extrait

La connaissance de la cinétique de dégradation des anthocyanes (ordre de réaction, constante de vitesse, énergie d'activation) est essentielle pour prédire la perte de qualité de l'extrait d'hibiscus. En effet, la perte des anthocyanes au cours du stockage se traduit par une évolution de la couleur de l'extrait, du rouge vers le marron. Cette évolution n'est pas souhaitable et affecte la qualité marchande de la boisson. L'étude cinétique a donc visé à étudier et calculer les paramètres cinétiques au cours du stockage. De manière logique, un accroissement de la température de stockage entraîne une forte augmentation de la vitesse de dégradation. La delphinidine 3-O-sambubioside présente les constantes de dégradation et l'énergie d'activation les plus élevées.

Les paramètres cinétiques identifiés grâce à la modélisation permettent de prévoir l'impact d'un traitement de stockage sur la concentration en anthocyanes de l'extrait dans une plage de températures comprises entre 4 et 37 °C. La similarité des valeurs identifiées dans la littérature pour des boissons aux compositions similaires montre la robustesse du modèle et des paramètres. Il pourra être envisagé d'utiliser ces données dans le cadre d'une optimisation des conditions de stockage ou l'une des contraintes serait la préservation d'une quantité d'anthocyanes, garantissant une couleur satisfaisante de la boisson. Ainsi, il est possible de calculer la température qu'il faut utiliser pour conserver au moins 80% et 70% respectivement de la cyanidine 3-O-sambubioside et delphinidine 3-O-sambubioside, pendant 25 jours. En considérant ces anthocyanes dans l'extrait, on obtient ainsi une température optimale de stockage de 17 °C. Ces conditions de stockage sont parfaitement applicables dans les pays d'Afrique notamment en Angola dans les régions de Huambo, Bié et Huila, où les températures moyennes annuelles sont inférieures à 18 °C. Cela permettrait aux habitants sans accès à l'électricité de pouvoir stocker le jus d'hibiscus à température ambiante, en tenant évidemment compte des aspects sanitaires lors de la fabrication. Il faut noter que l'hibiscus pousse spontanément dans ces régions mais sa valorisation reste encore peu développée.

3. Évolution des constantes d'équilibre en fonction de la température

L'effet de la température sur les constantes d'équilibre d'hydratation et d'acidité de la delphinidine 3-O-sambubioside et cyanidine 3-O-sambubioside a été étudié et les résultats de l'étude sont décrits dans la **publication 2**. La connaissance des valeurs des constantes d'acidité et d'hydratation est en effet un prérequis nécessaire pour appréhender l'étude des voies réactionnelles des anthocyanes mais également leurs propriétés colorantes en fonction des conditions du milieu. En fonction du pH et de la température du milieu, ces constantes permettent de prédire quelle forme de l'anthocyane sera majoritaire. En effet, certaines formes vont préférentiellement induire une réaction plutôt qu'une autre. La structure du cation flavylum, responsable de la couleur rouge, peut subir plusieurs modifications structurales. Ce cation est en équilibre avec deux formes principales, qui sont la base quinonique de couleur bleue (A) et la forme hémiacétalique incolore (B) (**publication 2**). Selon le pH, la base quinonique résulte d'une perte de protons très rapide à partir d'un groupe OH phénolique (en position C4', C5 ou préférentiellement en C7) tandis que la forme hémiacétalique est formée par l'addition beaucoup plus lente d'une molécule d'eau via une attaque nucléophile en position C2 avec une perte concomitante de proton. De manière plus anecdotique en termes de concentration, la forme B est en équilibre avec la cis-chalcone (Cc), elle-même en équilibre très lent avec la trans-chalcone (Ct). Ces équilibres sont caractérisés respectivement par les constantes d'acidité et d'hydratation globale K_a et K'_h . Il faut noter que la formation de la chalcone est influencée pas la température.

Lors de cette étude nous avons utilisé la méthodologie expérimentale du saut de pH pour pouvoir appréhender ces deux constantes. Nous avons choisi d'exploiter les valeurs expérimentales par deux approches : la méthode classique utilisant les valeurs d'absorbance au λ_{max} de l'anthocyane, développée par Brouillard (méthode de référence) et par Résolution Multivariée de Courbes (MCR), utilisée en analyse de mélanges, et mobilisant le spectre UV-Visible complet des anthocyanes. La méthode de Brouillard a permis d'obtenir des valeurs de constantes plus cohérentes avec la littérature. Les deux méthodes ont toutefois mis en évidence une constante d'hydratation de la delphinidine 3-O-sambubioside plus élevée que celle de la cyanidine 3-O-sambubioside. A un pH donné, la forme hydratée, connue comme plus instable que le cation flavylum, est plus abondante dans le cas de la

delphinidine 3-O-sambubioside que dans le cas de la cyanidine 3-O-sambubioside. Ceci pourrait expliquer en partie la dégradation thermique plus rapide observée pour la delphinidine 3-O-sambubioside.

La variation de température indique que les réactions de formation de la base quinonique et de la forme hémiacétal sont endothermiques. Cela est cohérent car une augmentation de la température favorise la forme hydratée plus labile. Cela expliquerait en partie l'effet de la température sur la dégradation des anthocyanes.

D'un point de vue méthodologique, l'exploitation par MCR peut être intéressante pour comparer différentes formes entre elles puisque les valeurs relatives sont cohérentes avec la méthode de référence. L'intérêt de cette approche est l'obtention des spectres purs des différentes formes en solution pour des molécules impliquées dans de nombreux équilibres et qui ne sont donc jamais pures en solution.

4. Elucidation de l'effet des constituants de l'extrait sur la dégradation des anthocyanes en milieux modèles

Différents facteurs endogènes et exogènes sont connus comme accélérateurs de la dégradation des anthocyanes. Les nombreux constituants de l'extrait identifiés et présentés dans la **publication 1** empêchent la discrimination de l'importance de l'effet de chacun d'eux sur la dégradation des anthocyanes. Ainsi, la stratégie adoptée est la simplification du milieu réactionnel. Pour cela, différentes approches ont été adoptées. Une première simplification consiste en l'élimination partielle de plusieurs constituants du milieu : dégazage pour évaluer l'effet de l'oxygène (dégazage de 5,6 ppm à moins de 0,5 ppm) et élimination d'une partie des constituants de l'extrait (élimination des minéraux, sucres, acides organiques) suivie de l'isolation de la fraction polyphénolique pour étudier les interactions entre polyphénols.

Une seconde stratégie permettant de moduler plus fortement la composition du milieu a été de réaliser des milieux modèles de complexité croissante avec quelques constituants de l'extrait en gardant le pH toujours à 2,2 (avec l'acide malique, prédominant dans l'extrait).

La dégradation des anthocyanes dans ces différents milieux modèles simplifiés est le sujet de la **publication 3**. Les effets de l'oxygène, des interactions entre polyphénols

tels que l'acide chlorogénique, l'acide gallique, le phloroglucinaldéhyde ainsi que les anthocyanes, la présence de métaux tels que Fe, Cu et Mn seuls ou en mélange et de la concentration en Fe sont discutés. Les différents composés étudiés et impliqués dans la dégradation des anthocyanes sont référencés dans le Tableau 24

Tableau 24 : synthèse des principaux composés impliqués dans la dégradation des anthocyanes

Composés impliqués	Effet sur la dégradation des anthocyanes	
	Cyanidine	Delphinidine
Oxygène	non	non
Polyphénols		
Acide chlorogénique	non	-
avec Mn	non	-
avec Fe	oui	oui
Anthocyanes	non	non
Produit de scission :		
Phloroglucinaldéhyde	oui	-
Acide gallique	-	oui
Métaux*		
Fe	oui	-
[Fe] 1-13ppm	oui	oui
Mn	non	-
Fe+Cu	oui	-
Fe+Cu+Mn	oui	oui

* concentrations similaires à celles de l'extrait

La présence de l'oxygène dans l'extrait n'induit pas directement la dégradation des anthocyanes car il n'y a pas été constaté une réactivité directe de l'oxygène avec les anthocyanes. En effet, dans son état fondamental, l'oxygène moléculaire existe à

l'état triplet (O_2) ce qui signifie qu'il possède deux électrons non appariés. Dans le cas de l'oxygène moléculaire, la paire d'électrons non appariés est contenue dans l'orbitale antiliante $2p\pi^*$ ce qui limite sa réactivité. L'oxygène triplet devient réactif lorsque il est converti en espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et son acide conjugué hydroperoxyde (HOO^{\cdot}), l'hydroxyle (HO^{\cdot}) le peroxyde (ROO^{\cdot}) et l'alcoxyde (RO^{\cdot}) qui sont des radicaux avec des électrons appariés. Ces radicaux peuvent être formés par des catalyseurs métalliques. Ces radicaux ne sont pas produits dans l'extrait non dégazé, qui contient les catalyseurs de la formation des formes radicalaires de l'oxygène.

Les anthocyanes se dégradent 2 fois moins vite dans la fraction polyphénolique (FP) que dans l'extrait. Les différences de composition entre l'extrait et la FP sont nombreuses. Outre la quasi-totale élimination des sucres et des acides organiques de l'extrait, les teneurs relatives en métaux (Fe, Cu et Mn) de même que celles des anthocyanes (dues à des pourcentages de pertes différents sur la résine) diffèrent entre l'extrait et la FP. Ces modifications de composition relative rendent toute interprétation difficile quant à la nature des composés (ou facteurs) responsables des différences de vitesses de dégradation observées dans l'extrait et dans FP. Afin de pouvoir appréhender l'effet de certains composés, le recours à des solutions modèles a été effectué.

Le premier milieu modèle testé contient les anthocyanes et de l'acide chlorogénique en présence de Fer. L'acide chlorogénique est le seul composé à présenter un effet antagoniste sur les deux anthocyanes : il augmente la dégradation de la cyanidine 3-O-sambubioside et protège la delphinidine 3-O-sambubioside. Si on traduit ces observations en termes d'oxydation, l'acide chlorogénique aurait un effet pro-oxydant vis-à-vis de la cyanidine alors qu'il exerce un effet antioxydant vis-à-vis de la delphinidine. L'interprétation de ces phénomènes n'en reste pas moins difficile pour plusieurs raisons. La première est liée à la possibilité de deux processus : complexation et oxydation. Les métaux et en particulier le fer sont à la fois des chélatants et des oxydoréducteurs. Les polyphénols qui possèdent des hydroxyles phénoliques adjacents (en position ortho sur le benzène) comme la delphinidine, la cyanidine ou l'acide chlorogénique sont aussi des espèces qui peuvent être chélatantes ou réductrices. En outre, les hydroxyacides comme le résidu quinique qui compose l'acide chlorogénique ou l'acide malique complexent également les métaux

et en particulier le fer. Par ailleurs, la complexation et l'oxydation dépendent du pH. Les anthocyanes forment des complexes avec les métaux par l'intermédiaire de leurs bases quinoniques présentes pour des pH > 5. Dans les milieux étudiés très acides, la complexation des anthocyanes ne doit pas être favorisée. En revanche le Fer III devient très oxydant dans ces conditions. Les formes pyrogallol (ortho tri-hydroxy) sont en général plus réductrices que leurs analogues catéchol (ortho di-hydroxy). La delphinidine par conséquent est le polyphénol le plus réducteur en comparaison avec la cyanidine et l'acide chlorogénique. Par contre, les potentiels oxydoréducteurs de l'acide chlorogénique et de la cyanidine doivent être proches du fait de la similitude de leur noyau B.

Compte-tenu de la composition des solutions modèles, il est fortement probable que la réaction de Fenton intervienne dans les processus et permette de régénérer le Fer III. De même, la complexation des hydroxyacides avec le Fer peut accélérer l'autoxydation du Fer II en Fer III. La régénération du Fer III est alors un processus pro-oxydant. Les produits formés lors de l'oxydation des polyphénols par le Fer III, semiquinones et ortho-quinones, sont-elles mêmes des oxydants potentiels vis-à-vis des autres espèces. Par conséquent, la superposition de tous ces phénomènes rend difficile l'interprétation des observations. Les effets antioxydant de l'acide chlorogénique vis-à-vis de la delphinidine et pro-oxydant vis-à-vis de la cyanidine nécessitent des études supplémentaires pour être correctement expliqués. En effet, il aurait été par exemple intéressant de réaliser d'autres solutions modèles pour compléter l'étude : la delphinidine en l'absence de toute autre espèce, la delphinidine en présence d'acide chlorogénique, l'acide chlorogénique en présence de fer. Par ailleurs, la mesure de la production du peroxyde d'hydrogène et de la consommation d'oxygène dans les solutions via un test à la ferrozine auraient pu permettre d'évaluer l'autoxydation.

La dégradation de la cyanidine en mélange avec le phloroglucinaldéhyde et le fer peut être aussi influencée par les ions ferriques pour les mêmes raisons qu'en solution avec l'acide chlorogénique. Cependant un autre processus, la polycondensation de l'aldéhyde avec le noyau A de l'anthocyane, pourrait contribuer à sa dégradation, en générant de nouveaux polymères.

L'étude des milieux modèles avec l'ensemble des métaux (Fe, Cu et Mn) suggère que cette combinaison pourrait être responsable en grande partie de la dégradation de la Del-3Sb dans l'extrait d'hibiscus. En effet, la comparaison des données cinétiques entre ce milieu modèle et l'extrait montre une similarité pour les valeurs de la constante de dégradation. Les trois métaux multivalents sont connus comme de bons catalyseurs des processus d'oxydation des polyphénols générant des polymères bruns.

Dans le cas de la cyanidine 3-O-sambubioside, une synergie entre le Fe, le Cu et le Mn a été notée. Le mélange de ces trois métaux a également augmenté fortement la vitesse de dégradation de la Cya-3Sb. Toutefois, les niveaux de dégradation obtenus dans le milieu modèle n'atteignent pas ceux mesurés dans l'extrait (constante de vitesse 2,6 fois supérieure dans l'extrait). La présence d'autres composés dans l'extrait et en quantité très faibles dans la fraction polyphénolique tels que les sucres ou même leurs produits de dégradation générés lors de la pasteurisation (furfural), peuvent être à la base de l'instabilité de la Cya-3Sb. La bibliographie mentionne que le glucose et le fructose, sucres réducteurs pouvant être impliqués dans les réactions de Maillard, sont les sucres majoritaires de l'extrait d'hibiscus (**publication 3**). La quantification individuelle des sucres et l'identification des furfurals après pasteurisation seraient nécessaires pour valider ces hypothèses. Cela permettrait de comprendre si ces molécules accélèrent la dégradation de la Cya-3Sb, sachant que le mécanisme de dégradation de la cyanidine par le furfural a déjà été décrit dans la littérature (Debick-Pospsil *et al.*, 1983).

5. Voies prépondérantes de la dégradation des anthocyanes dans l'extrait d'hibiscus

La formation des produits de dégradation des anthocyanes a été suivie d'une part par le dosage HPLC-DAD des produits de scission tels que le phloroglucinaldéhyde et les acides gallique et protocatéchique respectivement pour la Del-3Sb et Cya-3Sb, et d'autre part par spectrophotométrie par l'augmentation du pourcentage de la couleur polymérique représentative de la concentration des polymères bruns (**publication 3**).

Les deux voies de dégradation des anthocyanes, voies de scission et polymérisation sont schématisées sur la Figure 31.

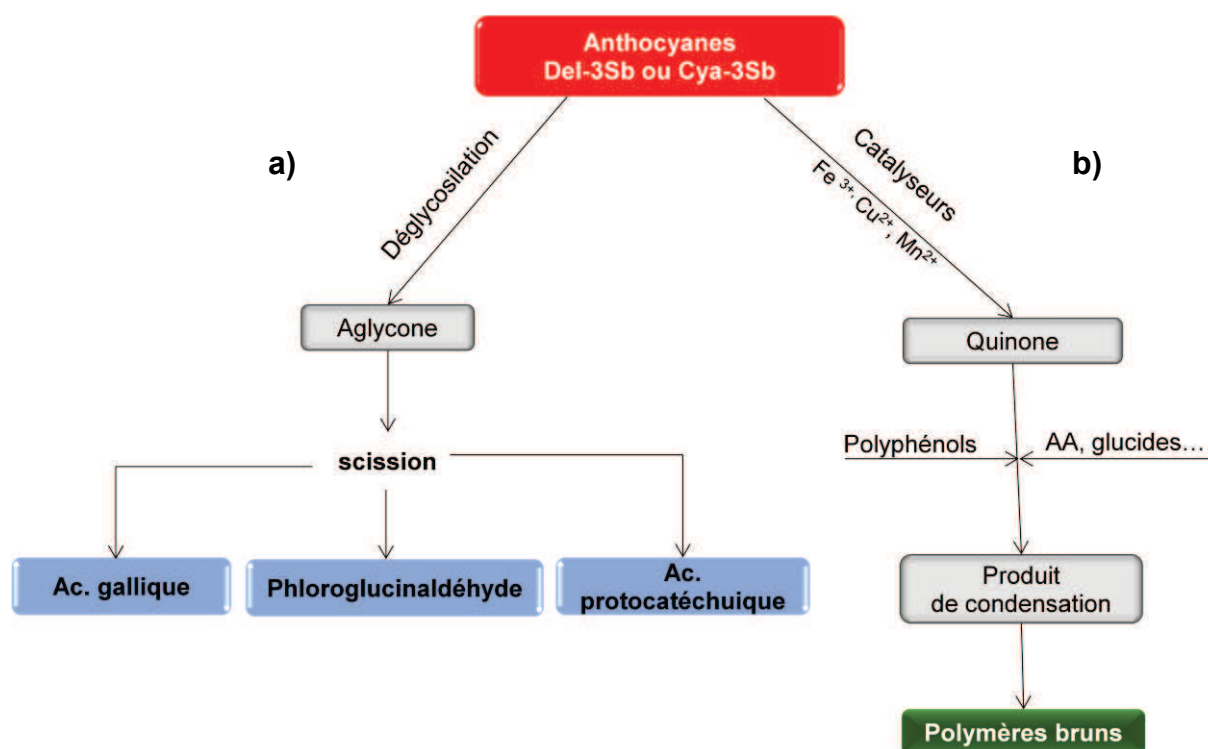


Figure 31 : schéma de synthèse des voies de scission a) et de polymérisation b) des anthocyanes d'hibiscus

La somme des constantes cinétiques de formation des différents produits de dégradation des anthocyanes (acide gallique, acide protocatéchuique et polymères) est assez proche de la constante globale de dégradation des anthocyanes. Cette similarité montre qu'il est probable que la scission et la polymérisation soient les deux voies prépondérantes de la dégradation des anthocyanes dans cet extrait.

La voie de scission est considérée minoritaire car la production des acides phénols (composés stables dans cette étude) ne représente que 10% en moles des anthocyanes dégradées (**publication 2 et 3**). Pour confirmer ce résultat, il serait intéressant de compléter le bilan molaire en intégrant aussi le phloroglucinaldéhyde. En effet, ce composé n'a pu être dosé au cours de ce travail car il était co-élué avec d'autres composés.

L'importance de la voie de scission des deux anthocyanes semble diminuer avec l'augmentation de la concentration en Fe^{3+} (**publication 3**) si on exclut la possibilité que les acides phénoliques (gallique et protocatéchuique) que l'on dose sont eux-même oxydés par le fer. Sachant que l'augmentation de la concentration en Fe^{3+} augmente la dégradation des anthocyanes, cela implique que d'autre(s) voie(s),

notamment la voie de la polymérisation, sont favorisées par l'augmentation de la concentration en fer.

Le rendement molaire des produits de scission évolue différemment selon l'anthocyane considérée lorsque cuivre et manganèse sont ajoutés au fer (**publication 3**). Ainsi, l'ajout de ces deux métaux augmente le rendement molaire de production de l'acide gallique, contrairement à celui de l'acide protocatéchique qui diminue par rapport à la solution modèle correspondante ne contenant que du fer.

L'identification des produits finaux de la dégradation des anthocyanes, ainsi que l'augmentation du pourcentage de la couleur polymérique qui traduit la présence de polymères anthocyaniques, a permis de proposer, dans des conditions aqueuses acides, un mécanisme de dégradation par scission et l'autre par polymérisation (via des métaux de transition). L'identification et la quantification des polymères qui se forment restent toutefois nécessaires.

6. Étude de la voie de polymérisation

6.1 Paramètres colorimétriques de l'extrait

6.1.1 Densité de la couleur

Dans un système aussi complexe que l'extrait, la couleur rouge est la résultante globale des absorbances de l'ensemble des composés colorés présents (anthocyanes, oligomères et pigments polymères). Ce paramètre colorimétrique est présenté sur la Figure 32.

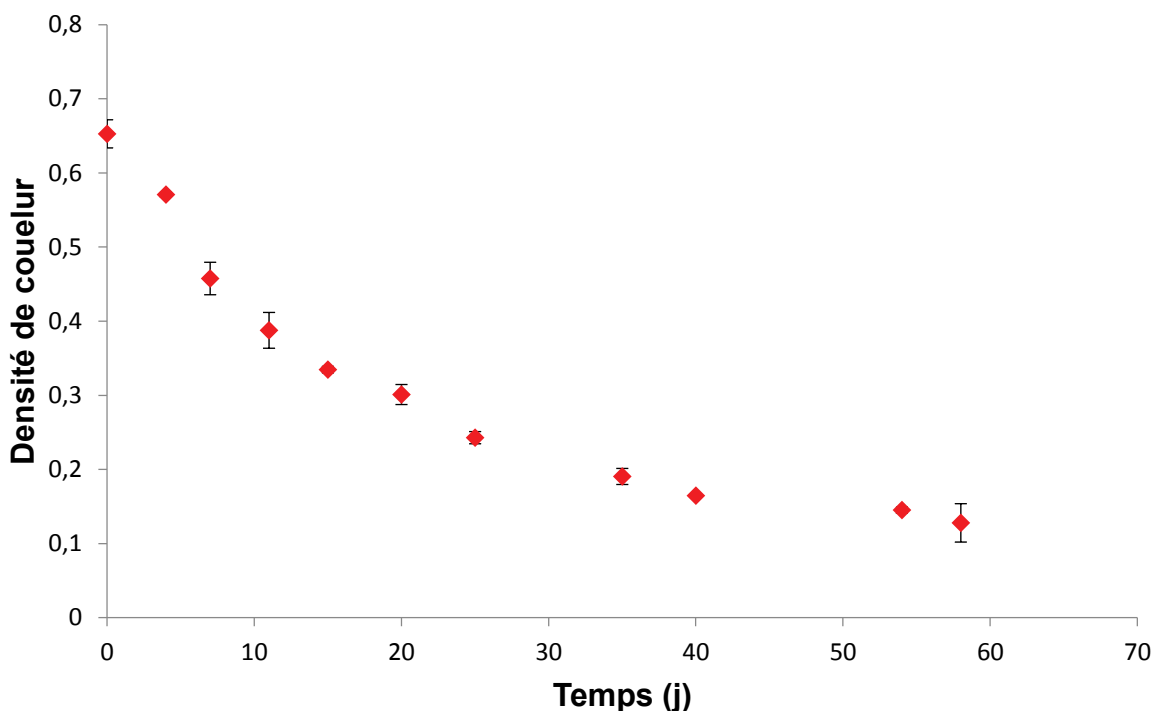


Figure 32 : évolution de la densité de couleur dans l'extrait durant le stockage à 37 °C

La densité de la couleur de l'extrait chute rapidement au cours du stockage. Après 60 j à 37 °C, 97% de la couleur est perdue. Cela pourrait être le résultat d'une dégradation complète des anthocyanes en raison de la longue durée de stockage et de la température élevée utilisée. Cisse *et al.* (2012) ont également mis en évidence une diminution progressive de la densité de la couleur dans un extrait d'hibiscus similaire stocké à 30 °C. L'allure de la cinétique de perte de densité suit d'ailleurs l'allure de la perte des formes monomères à savoir une exponentielle décroissante. Cela veut dire également que les pigments absorbant à 420 nm formés ne compensent pas en termes de densité de couleur la perte des formes monomères.

6.1.2 Pourcentage de couleur polymérique

L'évolution de la couleur polymérique, définie comme étant la couleur résiduelle après addition de métabisulfite de sodium, est présentée sur la Figure 33.

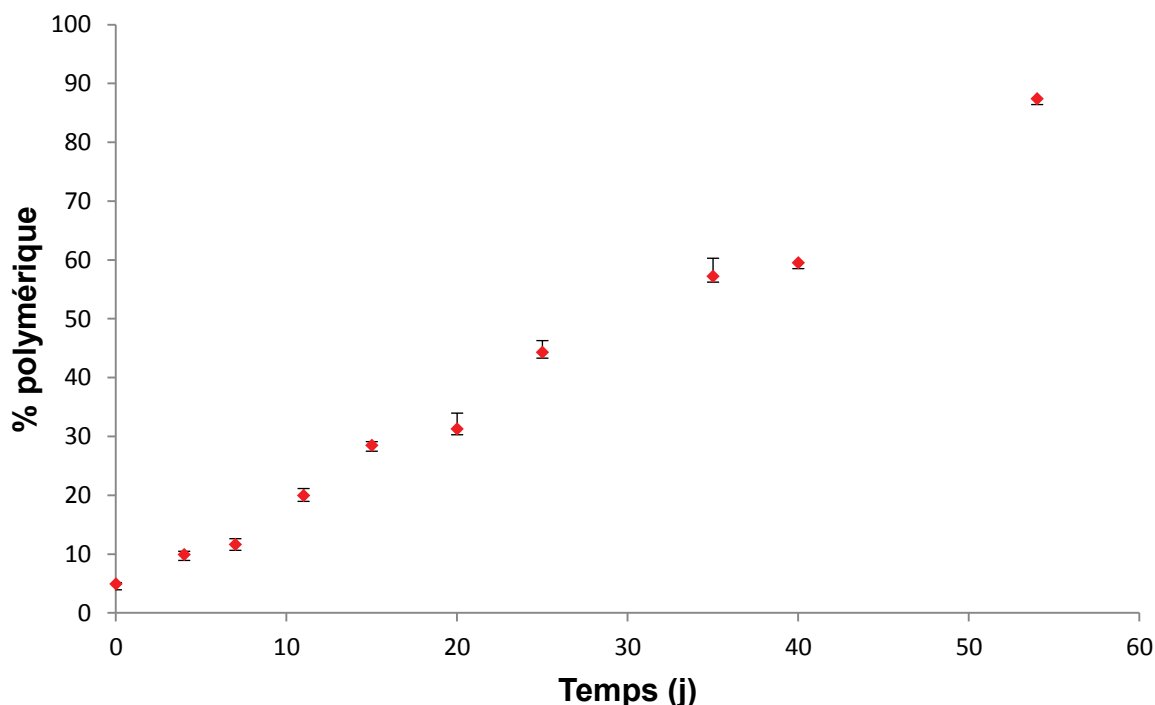


Figure 33 : évolution du pourcentage de couleur polymérique dans l'extrait durant le stockage à 37 °C

Le pourcentage de couleur polymérique augmente de manière linéaire dans l'extrait durant le stockage jusqu'à 87% pour l'extrait après 58 j.

6.2 Paramètre colorimétrique dans les fractions monomériques et polymériques

La chromatographie d'exclusion a été utilisée pour séparer les pigments en fonction de leur taille lors du stockage de l'extrait à 37 °C.

L'extrait d'hibiscus a été séparé en 6 fractions dont l'absorbance à 520 nm augmente pour la fraction F1 et diminue pour toutes les autres fractions (Annexe B). L'indice de brun augmente plus fortement dans la fraction F1 (Annexe C).

A titre d'exemple au cours du stockage, la densité de couleur dans la fraction F1 augmente alors que dans la fraction F3, fraction ayant la coloration rouge la plus intense, celle-ci diminue nettement (Figure 34). Il est donc probable et logique que la fraction F1 contienne les molécules à hauts poids moléculaire, issues de la condensation des anthocyanes, n'ayant pas été retenues par le gel. La fraction F3 serait constituée principalement des formes monomères qui se dégradent selon une cinétique d'ordre 1.

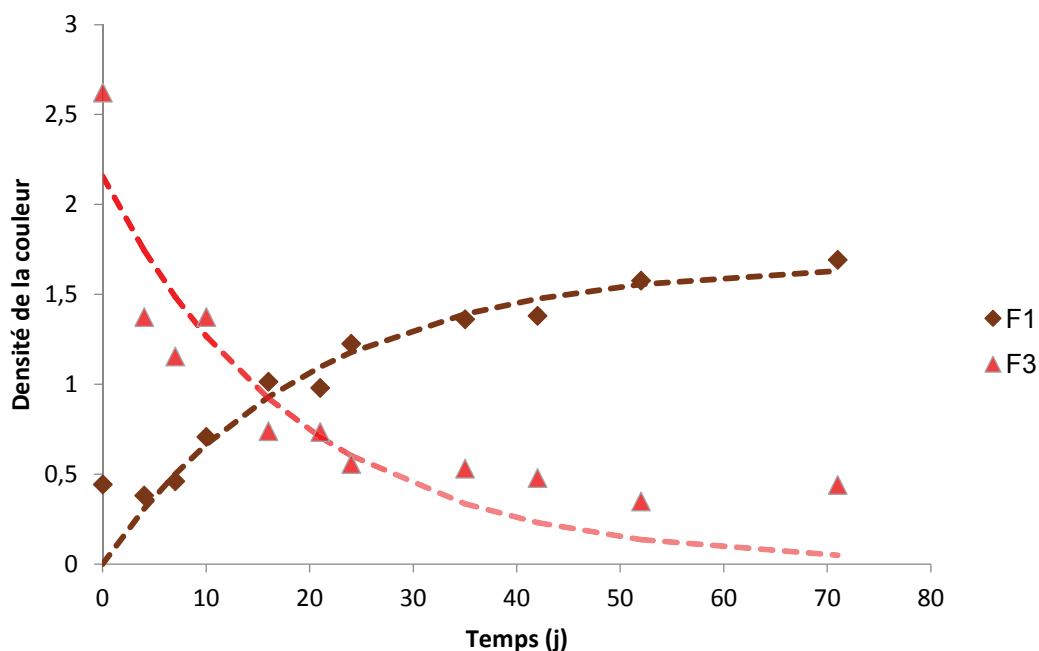


Figure 34 : évolution de la densité de couleur dans les fractions F1 et F3 de l'extrait durant le stockage à 37 °C

L'évolution de la couleur polymérique (Figure 35) est bien représentée par un modèle cinétique d'ordre un. Au cours du stockage à 37 °C, la couleur polymérique de la fraction F1 augmente avec une constante de vitesse de $3,93 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ($0,79 \cdot 10^{-7}$). A *contrario*, la couleur polymérique de la fraction F3 ne varie pas au cours du temps.

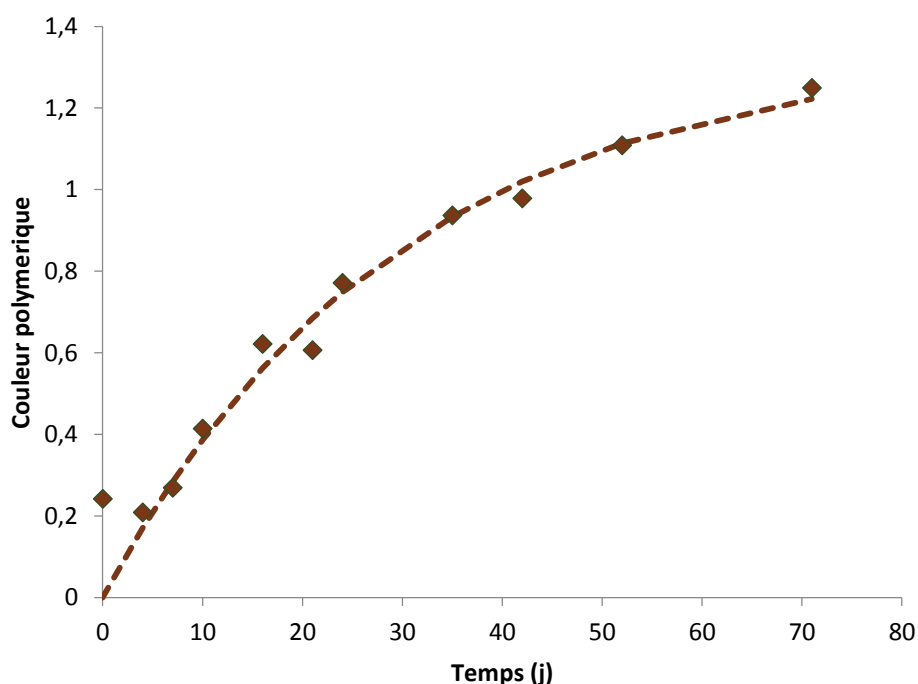


Figure 35 : évolution de la couleur polymérique dans la fraction F1 de l'extrait au cours du stockage à 37 °C

Notons que la somme des constantes de vitesse d'apparition des produits de dégradation des anthocyanes ($k_{(\text{acide gallique})} 3,39 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1} + k_{(\text{acide protocatéchuïque})} 1,96 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1} + k_{(\text{polymères})} 3,93 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ est égale à $9,28 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) ce qui est assez proche de la constante de vitesse moyenne de dégradation des anthocyanes ($8,8 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$). Ce calcul permet de valider que la dynamique de production des polymères est bien évaluée par méthode colorimétrique et permet de mettre en évidence la prépondérance relative des deux voies de dégradation des anthocyanes.

Une étude plus fine des caractéristiques spectrales des espèces en solutions dans l'extrait peut être menée par déconvolution des spectres à la fois de la fraction monomérique et de la fraction polymérique.

6.3 Évolution des spectres UV-vis des fractions F1 et F3 et déconvolution par la MCR

L'évolution des spectres UV-vis des fractions F1 et F3 est présentée sur les figures Figure 36 A et 36B.

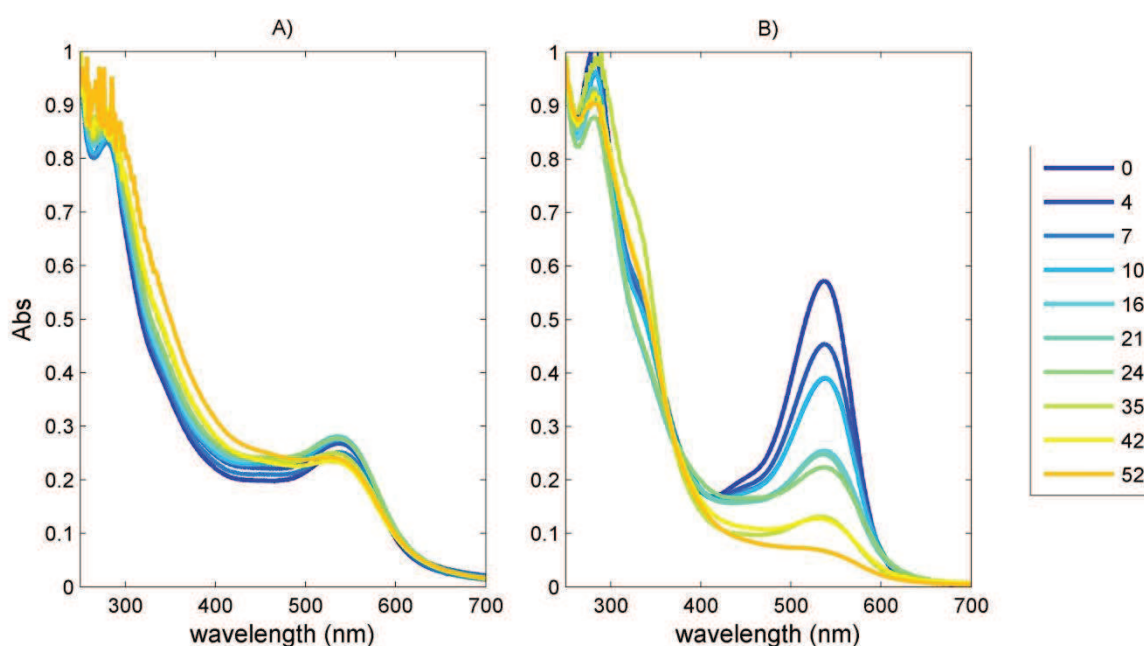


Figure 36 : évolution des spectres des extraits fractionnés au cours du stockage (en jours) : A) fraction F1 des molécules à haut poids moléculaire et B) fraction F3 des molécules à faible poids moléculaire

Dans la Figure 36 A, un plateau est observé entre 400 et 500 nm. L'absorbance dans cette région du spectre ne cesse d'augmenter au détriment de la région supérieure à

500 nm qui correspond aux anthocyanes monomériques. La diminution d'absorbance dans la région des monomères est encore plus remarquable sur les spectres de la fraction F3 (Figure 36B). Cette tendance est en accord avec la diminution des teneurs en anthocyanes observée dans l'extrait au cours du stockage (**publication 2**). Le spectre UV-Vis de la fraction polymérique a montré une augmentation des absorbances autour de 450 nm qui est la bande caractéristique des ions xanthylum. Ces ions peuvent être formés par condensation des anthocyanes avec d'autres anthocyanes ou polyphénols par l'intermédiaire éventuellement d'aldéhydes. Ils sont connus pour être en partie responsables du changement de la couleur du vin au cours du vieillissement (Es-Safi *et al.*, 2000; Fulcrand *et al.*, 2006). Les anthocyanes et les composés phénoliques réagissent très lentement avec la formation éventuelle de sels de xanthylum jaunes (un présumé glycosylé et une aglycone) qui se traduit par l'augmentation des absorbances autour de 440 nm (C. Timberlake and Bridle, 1976). Le mécanisme de réaction connu comme anthocyanine-flavanols (A*-F), a été résumé par Fulcrand *et al.* (2006) où l'anthocyane, dans sa forme flavylum, réagit comme un électrophile avec un flavanol nucléophile C8/C6, avec les atomes de carbone partiellement chargés négativement dans le cycle A. Ce mécanisme a conduit à la formation du cation xanthylum à pH inférieur à 3,8.

D'un point de vue sensoriel, la présence des polymères dans l'extrait d'hibiscus est indésirable pour le consommateur car elle modifie la couleur de l'extrait. De plus, ces composés peuvent provoquer l'apparition de dépôts et de trouble dans la solution du fait de la précipitation/ insolubilisation des molécules à haut poids moléculaire.

La déconvolution des spectres par MCR réalisée sur les fractions F1 et F3 obtenues par chromatographie d'exclusion est présentée respectivement sur les Figure 37a et 37b. Cette déconvolution a été facilitée par l'ajout à la matrice expérimentale des spectres des standards des anthocyanes, et des acides chlorogénique, gallique et protocatéchique.

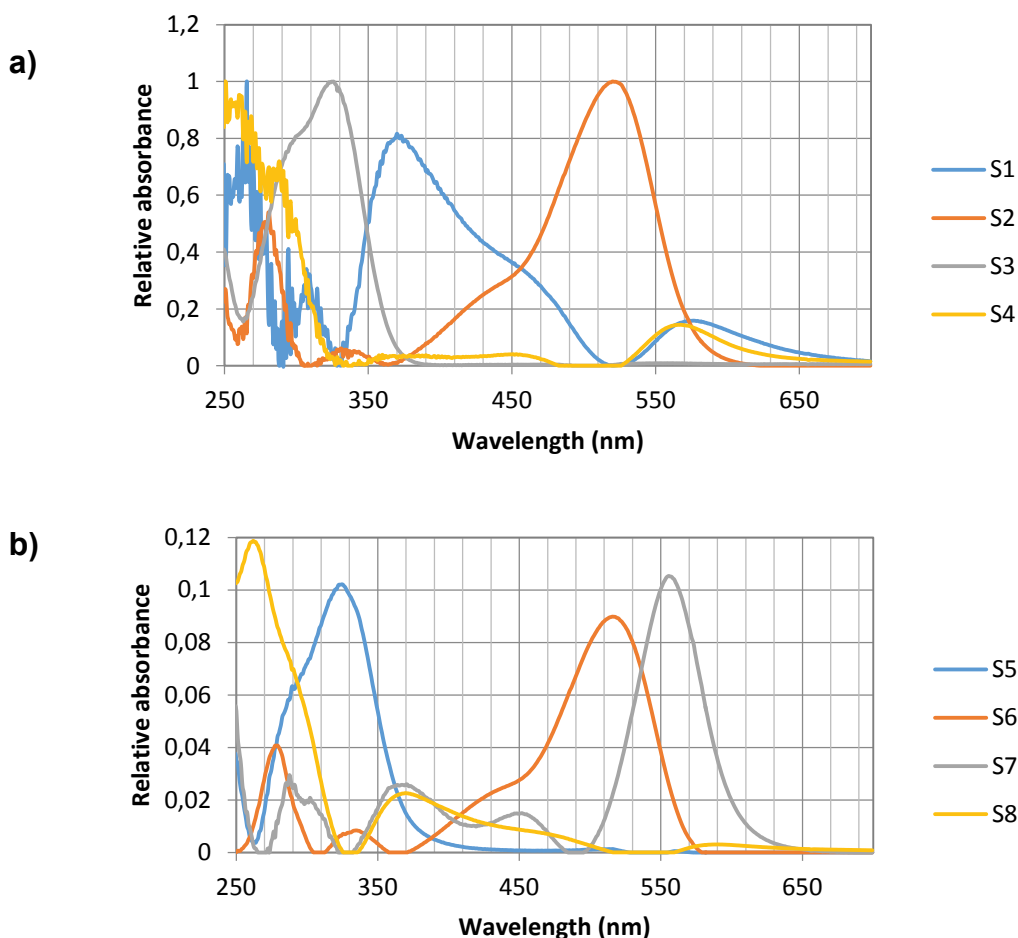


Figure 37 : spectres purs obtenus par MCR sur a) fraction F1 des molécules à haut poids moléculaire et b) fraction F2 des molécules à faible poids moléculaire

Six spectres ont été clairement identifiés comme ceux des anthocyanes (S2 et S6), d'acides chlorogéniques (S3 et S5) et des produits de scission (acides gallique S4 et protocatéchique S8). Dans la fraction des molécules à haut poids moléculaire, S1 pourrait être le spectre de composés qui absorbent entre 350 et 450 nm comme par exemple des polymères condensés issus de la dégradation des anthocyanes. Dans la fraction des composés à bas poids moléculaire, S7 pourrait correspondre au spectre d'autres formes d'anthocyanes en équilibre avec l'ion flavylium, comme la base quinonique ou la forme hydratée (**publication 2**).

Cinq spectres obtenus sur les fractions F1 et F3 sont utilisés pour la déconvolution des spectres cette fois sur l'extrait. Il s'agit des spectres S1 (attribué aux polymères), S2 (anthocyanes), S3 (acide chlorogénique), S4 (produits de scission) et S6 (autres anthocyanes en équilibre). Après 41 itérations sur la matrice expérimentale

additionnée des spectres S1, S2, S3 et S6, une solution est trouvée (R^2 de 0,99) : les concentrations relatives des différentes espèces sont présentées en Figure 38.

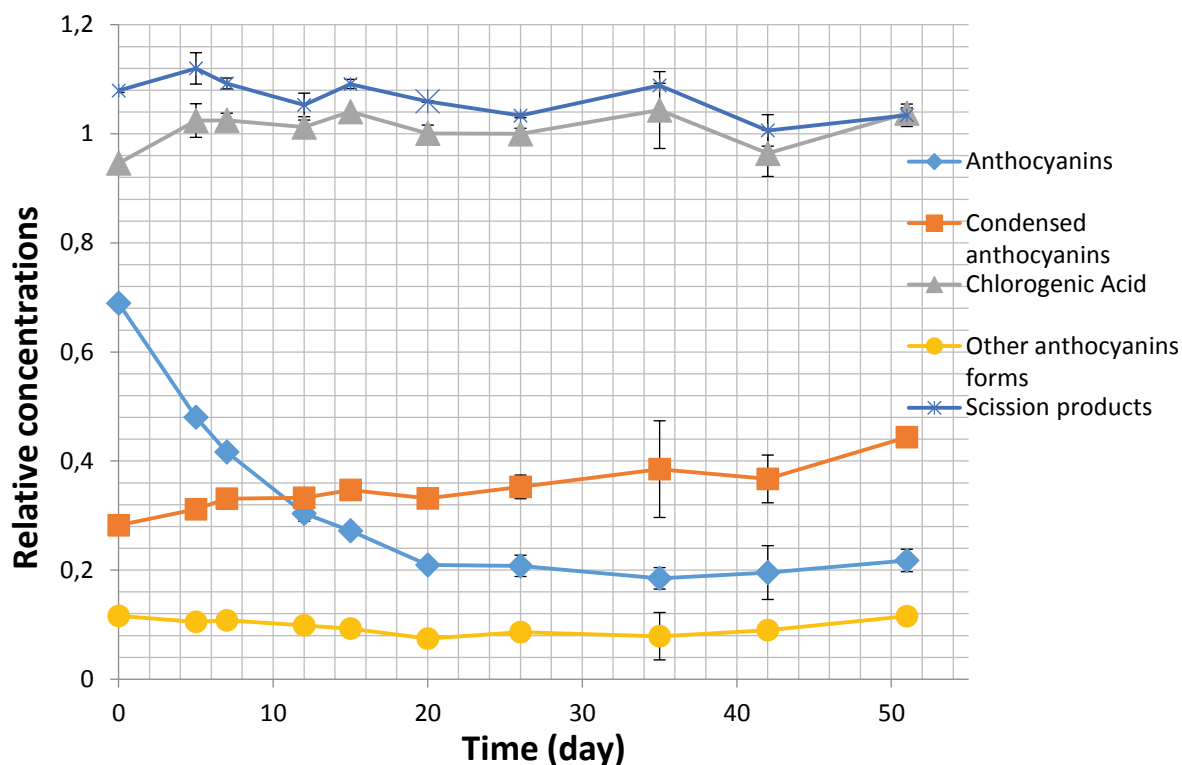


Figure 38 : concentrations relatives des différentes espèces obtenues par MCR sur les spectres de l'extrait au cours du stockage

Les anthocyanes décroissent de manière exponentielle, ce qui est en accord avec les résultats observés. La constante cinétique calculée à partir de cette courbe est de $5,9 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ce qui est proche de la constante moyenne de la Cya-3Sb et la Del-3Sb de $8,9 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. L'autre évolution notable est celle des molécules condensées qui augmentent d'un facteur 1,6. Encore une fois, cette augmentation est plus faible que celle observée avec la couleur polymérique. Ceci est probablement dû au fait que les concentrations obtenues par MCR sont relatives et non absolues et aux différences probables de coefficient d'extinction molaires des monomères et des polymères.

Étant donné que la couleur polymérique reste stable et que la densité de couleur diminue dans la fraction F3, cela signifie qu'elle est majoritairement composée d'anthocyanes monomères. La diminution de la densité de couleur corrobore la dégradation des anthocyanes au cours du stockage. Au contraire pour la fraction F1, l'augmentation à la fois de la densité de couleur et de la couleur polymérique semble

indiquer l'existence de réactions de polymérisation dans l'extrait durant le stockage. Les polyphénols présents dans l'extrait (autres que les anthocyanes) n'évoluant pas, il s'agit peut-être dans notre cas d'autopolymérisation oxydative des anthocyanes d'autant que l'augmentation de la concentration en fer augmente la constante de vitesse de polymérisation (**publication 3**). L'origine peut être une perte de protons donnant une quinone puis une orthoquinone électrophile qui se condenserait avec une forme hydratée nucléophile.

6.4 Étude de la fraction polymérique

Les fractionnements successifs réalisés sur l'extrait (gel d'exclusion, HPLC semi-préparative) ont conduit à l'obtention de 3 fractions. Les chromatogrammes de ces fractions semblent indiquer la présence dans chacune d'elles d'un ensemble de molécules de degrés de polymérisation différents présentant ainsi toute une distribution de masse avec des composés de polarités différentes. Un exemple en est donné sur la Figure 39.

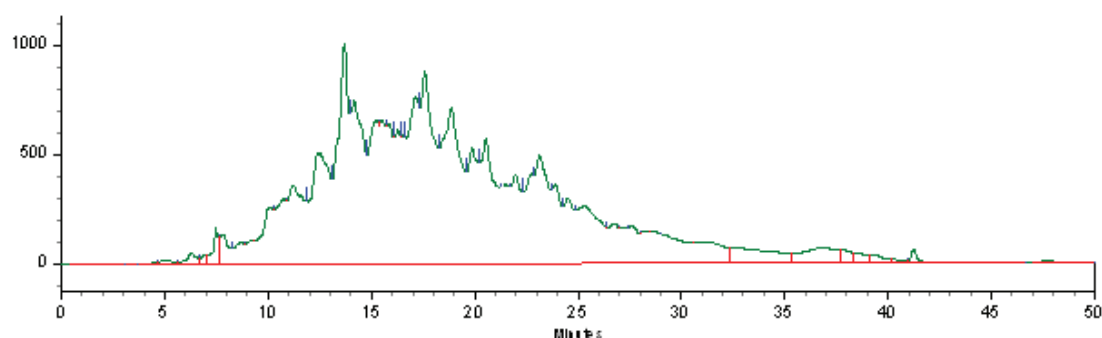


Figure 39 : chromatogramme de la fraction F1 purifiée à la CLHP préparative

Une analyse en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), permettrait d'apporter des informations supplémentaires sur la structure de ces polymères. Une tentative d'identification par RMN a été réalisée sur un extrait stocké pendant 2 mois à 37 °C et concentré. Les résultats n'ont pas permis d'obtenir d'informations précises sur leur structure si ce n'est la présence de sucres (spectre du proton, 3-4 ppm) (Annexe D).

En effet, on peut s'attendre à une très grande hétérogénéité des structures formées, inhérente d'une part aux différentes formes des anthocyanes (cation flavilyum, formes hydratées, bases quinoniques) et d'autre part aux différents mécanismes de

dégradation en compétition. La RMN n'est pas une technique d'analyse sensible et de ce fait ne permet pas une analyse fine des milieux complexes.

Une hydrolyse acide de la fraction F1 purifiée a entraîné une augmentation du temps de rétention des composés que l'on pourrait attribuer à une diminution de la polarité du groupe de molécules (Figure 40), qui serait en accord avec la présence de liaisons glycosidiques au sein des structures.

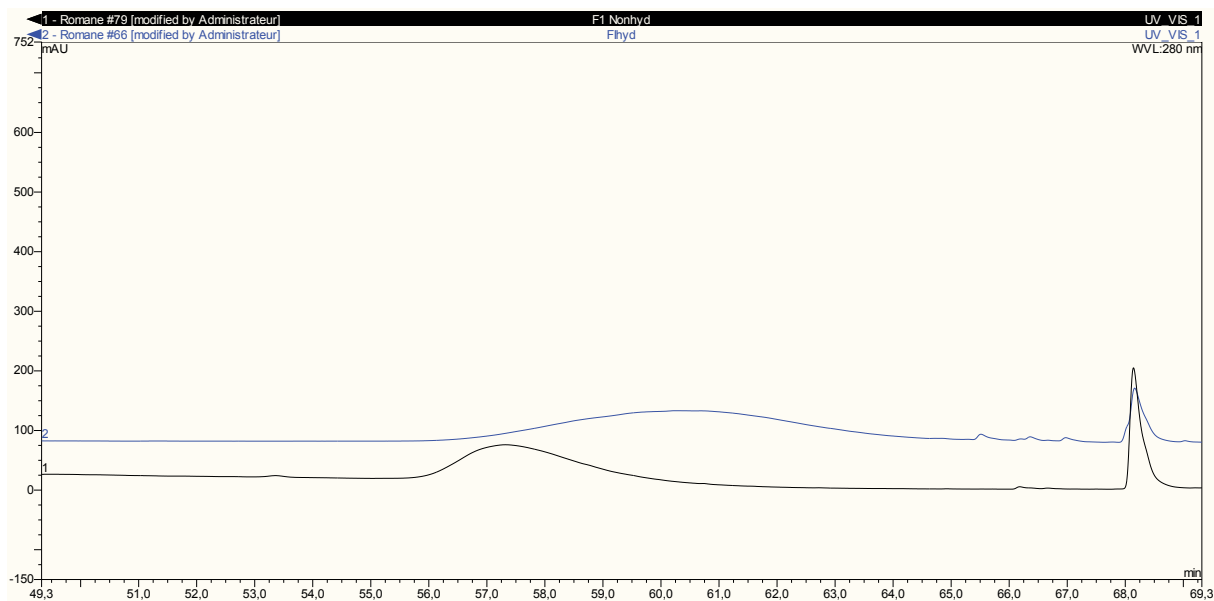


Figure 40 : chromatogrammes CLHP à 280 nm de la fraction F1 purifiée avant hydrolyse (trait noir) et après hydrolyse (trait bleu)

L'analyse des solutions par CLPH munie d'un réfractomètre n'a pas permis de confirmer la libération de sucres durant l'hydrolyse.

Jusqu'à présent, aucune information précise n'a été rapportée dans la littérature sur la structure des polymères issus de la dégradation des anthocyanes majoritaires d'hibiscus.

La caractérisation complète des polymères issus de la dégradation des anthocyanes d'hibiscus reste donc un champ de recherche ouvert, d'un grand intérêt pour caractériser toutes les voies de dégradation des anthocyanes pendant le stockage d'un tel extrait. L'élucidation des structures permettrait d'identifier complètement les mécanismes réactionnels à l'origine de la dégradation des anthocyanes et d'envisager les leviers potentiels même si la concentration des métaux et la

température se sont déjà révélés comme des facteurs très impactants. La caractérisation des propriétés colorantes des polymères formés et leur quantification permettraient d'établir plus finement les relations entre la composition chimique du milieu et les modifications de la couleur pendant la production et le stockage de l'extrait. Si les mécanismes impliqués dans de telles modifications sont bien compris, les procédés de transformation et de stabilisation pourraient alors être optimisés pour améliorer la stabilité de la qualité organoleptique des boissons ou extraits colorants à base d'*Hibiscus sabdariffa*.

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusions générales et perspectives

Ce travail de thèse avait pour objectif d'approfondir l'étude mécanistique et cinétique de la dégradation des anthocyanes dans un extrait d'*Hibiscus sabdariffa* dans le but d'une meilleure maîtrise de la qualité organoleptique des boissons. Au terme de ce travail, nous avons mis en évidence les voies majoritaires de dégradation des anthocyanes dans le bissap. La voie d'autopolymérisation activée par plusieurs métaux dont le fer, le cuivre et le manganèse est prépondérante. La voie de scission des anthocyanes intervient également mais de façon mineure. Ces deux réactions conduisent à une modification de la couleur via la production de polymères bruns et une diminution de l'intensité colorante de la boisson. Nous avons également caractérisé les formes d'anthocyanes majoritaires grâce au calcul des constantes d'équilibres à plusieurs températures. L'effet de la structure de l'anthocyane et de la température sur la prédominance de la forme la plus réactive a pu être ainsi évalué.

Les deux voies de dégradation ont été caractérisées de manière cinétique à plusieurs températures, individuellement pour les deux anthocyanes. Ainsi, il est possible de prédire les dégradations au cours d'un stockage. Cette étude montre par exemple que pour conserver 75 % des anthocyanes pendant 25 j, une température de stockage de 17 °C doit être choisie. Ces conditions de stockage sont parfaitement applicables dans les pays d'Afrique notamment en Angola. Il sera toutefois nécessaire de réaliser des analyses sensorielles pour tester l'acceptabilité du jus d'hibiscus conservés dans ces conditions.

D'un point de vue méthodologique, ces résultats ont pu être obtenus grâce à une étude en milieux modèles de complexité variable et contrôlée, à l'utilisation de différentes techniques d'analyses spectrales et chromatographiques et enfin à une approche cinétique et chimiométrique.

A ce point de nos investigations, plusieurs perspectives de recherches mériteraient d'être envisagées.

Au niveau mécanistique, il serait intéressant d'identifier et de quantifier les sucres et leurs produits de dégradation dans l'extrait d'hibiscus lors du traitement thermique et du stockage. De nouveaux milieux modèles pourraient ensuite être réalisés afin d'élucider l'influence de ces composés sur la dégradation de la Cya-3Sb notamment.

L'étude de l'évolution du profil d'acides aminés au cours des traitements permettrait d'évaluer l'implication de ces solutés dans la dégradation des anthocyanes. De plus, il serait pertinent d'expliquer plus finement les différences de réactivité entre les deux anthocyanes notamment en présence d'autres polyphénols et de métaux. Enfin, l'étude de la voie de polymérisation devra être approfondie en élucidant la structure des polymères bruns.

D'un point de vue cinétique, un travail sur les deux voies de dégradation serait nécessaire pour préciser l'impact de la température sur leur prépondérance respective. Ceci permettrait de prédire non seulement les pertes en anthocyanes mais également l'accumulation des produits de dégradation, notamment les polymères impactant la couleur de l'extrait. L'accès aux énergies d'activations des deux voies permettrait une optimisation plus fine des conditions de stockage et un meilleur contrôle des propriétés organoleptiques finales des boissons. Le modèle cinétique pourrait enfin être complexifié par l'intégration des constantes d'équilibres. Cette démarche devrait conduire à l'élaboration d'un modèle plus générique, utile pour représenter et prédire la dégradation d'autres anthocyanes, dans d'autres matrices au cours de traitements thermiques ou de stockage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- Abou-Arab, A. A., Abu-Salem, F. M. & Abou-Arab, E. A. (2011). Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus subdariffa*). *Journal of American Science*, 7(7), 445-456.
- Adam, J. G. & Ongley, M. H. (1973). The degradation of anthocyanins in canned strawberries. The effect of various processing parameters on the retention of pelargonidin-3-glucoside. *J. Food Technolol*, 8, 139-145.
- Adams, J. B. (1973). Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100.deg. *J Sci Food Agric*, 24, 747-762.
- Alighourchi, H. & Barzegar, M. (2009). Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Food Engineering*, 90(179–185).
- Asen, S., Stewart, R. N. & Norris, K. H. (1972). Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11, 1139–1144.
- Aurelio, D. L., Edgardo, R. G. & Navarro, G. S. (2008). Thermal kinetic degradation of anthocyanins in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion. *Food Sci*, 43(2), 322-325.
- Benítez, P., Castro, R., Jose Antonio Sanchez, P. & Barroso, C. G. (2002). Influence of metallic content of fino sherry wine on its susceptibility to browning. *Food research international*, 35(8), 785-791.
- Bloor, S. J. & Falshaw, R. (2000). Covalently linked anthocyanin-flavonol pigments from blue *Agapanthus* flowers. *Phytochemistry*, 53, 575-579.
- Bobbio, F. O. & Mercadante, A. Z. (2008). Anthocyanins in foods: Occurrence and physicochemical properties. In F. O. Bobbio, & A. Z. Mercadante (Eds.), *Food colorants: Chemical and functional properties*, Vol. 1. (pp. 241–276) Boca Raton: CRC Press.
- 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.

- Broenum-Hansen, K. & Flink, J. M. (1985). Anthocyanin colorants from elderberry (*Sambucus nigra* L.). 3. Storage stability of the freeze dried product. *J Food Technol*, 20, 725-733.
- Brouillard, R. (1981). Origin of the exceptional colour stability of the Zebrina anthocyanin. *Phytochemistry*, 22, 1311-1323.
- Brouillard, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. In P. Markakis (Ed.), *Anthocyanins as food colors* (pp. 1-40). New York: Academic Press Inc.
- Brouillard, R. (1993). The Flavonoids, *Advances in research since 1986*, Ed J. B. Harborne. Chapman and Hall, London.
- Brouillard, R. & Delaporte, B. (1977). Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society*, 99(26), 8461-8468.
- Brouillard, R. & Dubois, J.-E. (1977). Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society*, 99(5), 1359-1364.
- Brownmiller, C., Howard, L. R. & Prior, R. L. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, 73(15), 72-79.
- Cabrita, L., Fossen, T. & Andersen, O. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem*, 68, 101-107.
- Cacho, J., Castells, J. E., Esteban, A., Laguna, B. & Sagristá, N. (1995). Iron, copper, and manganese influence on wine oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(3), 380-384.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A. & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Cemeroglu, B., Velioglu, S. & Isik, S. (1994). Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *Journal of Food Science*, 59(6), 1216-1218.
- Cisse, M. (2010). *Couplage de procédés membranaires pour la production d'extraits anthocyaniques: application à Hibiscus sabdariffa*. Montpellier, SupAgro.

- Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., MarDiop, C., Reynes, M. & Sock, O. (2009a). La production du bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) au Sénégal. *Fruits*, 64(02), 111-124.
- Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., Ndiaye, A., Reynes, M. & Sock, O. (2009b). Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations. *Fruits*, 64(3), 179-193.
- Cissé, M., Vaillant, F., Acosta, O., Dhuque-Mayer, C. & Dornier, M. (2009). Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from blood orange, Blackberry, and Roselle Using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models. *Food Chem*, 57, 6285-6291.
- Cisse, M., Vaillant, F., Kane, A., Ndiayea, O. & Dornier, M. (2012). Impact of the extraction procedure on the kinetics of anthocyanin and colour degradation of roselle extracts during storage. *J Sci Food Agric*, 92, 1214–1221.
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins- nature, occurrence and dietary burden. *Science of Food and Agriculture*, 80, 1063-1072.
- Clydesdale, F. M., Francis, F. J. & Main, J. H. (1979). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Anthocyanins colorants for beverages and gelatin dessert. *Food Protection*, 42(3), 204-207.
- Coly, E. V., Seck, P. A. & Mbaye, A. A. (2005). Les productions horticoles, in : Bilan de la recherche agricole et agroalimentaire au Sénégal 1964–2004, ISRA-ITA-CIRAD, Sénégal.
- D’Heureux–Calix, F. & Badrie, N. (2004). Consumer acceptance and physicochemical quality of processed red sorrel/roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) sauces from enzymatic extracted calyces. *Food Serv. Technol*, 4, 141–148.
- da Costa, C. T., Nelson, B. C., Margolis, S. A. & Horton, D. (1998). Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 799(1-2), 321–327.
- Dangles, O. & Brouillard, R. (1992). Polyphenol interactions. The copigmentation case: Thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. Medium effect. *Canadian Journal of Chemistry*, 70(8), 2174–2189.
- Dangles, O. & Elhajji, H. (1994). Synthesis of 3-methoxy- and 3-(β -D-glucopyranosyloxy) flavylum ions. Influence of the flavylum substitution

- pattern on the reactivity of anthocyanins in aqueous solution. *Helvetica Chimica Acta*, 77(6), 1595-1610.
- Dangles, O., Saito, N. & Brouillard, R. (1993a). Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*, 34, 119-124.
- Dangles, O., Saito, N. & Brouillard, R. (1993b). Kinetic and thermodynamic control of flavylium hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of *Pharbitis nil*. *Journal of the American Chemical Society*, 115(8), 3125-3132.
- Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine : central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(12), 73-85.
- Dao, L. T., Takeoka, G. R., Edwards, R. H. & Berrios, J. D. J. (1998). Improved method for the stabilization of anthocyanidins. *J Agric Food Chem*, 46, 3564-3569.
- Daravingas, G. & Cain, R. F. (1968). Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model systems. *J Food Sci*, 33, 138-142.
- Davies, A. J. & Mazza, G. (1993). Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(5), 716-720.
- de Levie, R. (2012). *Advanced Excel for Scientific Data Analysis* (3 ed.). Brunswick, Maine USA: Atlantic Academic LLC.
- Debick-Pospsil, J., Lovric, T., Trinajstic, N. & Sabjic, A. (1983). Anthocyanin Degradation in the Presence of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural. *Journal of food science*, 48(2), 411-416.
- Dougall, D. K. & Baker, D. C. (2008). Effects of reaction mixture and other components on the determination of the equilibrium and rate constants of the hydration reactions of anthocyanins. *Food Chemistry*, 107(1), 473-482.
- Es-Safi, N.-E., Le Guernevé, C., Cheynier, V. & Moutounet, M. (2000). New phenolic compounds formed by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic solution and their implication in color changes of grape-derived foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(9), 4233-4240.
- Esparza, I., Salinas, I., Caballero, I., Santamaria, C., Calvo, I., Garcia-Mina, J. M. & Fernandez, J. M. (2004). Evolution of metal and polyphenol content over a 1-

- year period of vinification: sample fractionation and correlation between metals and anthocyanins. *Analytica chimica acta*, 524(1), 215-224.
- Fernández-Arroyo, S., Rodríguez-Medina, I. C., Beltrán-Debón, R., Pasini, F., Joven, J., Micol, V., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of Hibiscus sabdariffa aqueous extract. *Food research international*, 44(5), 1490-1495.
- Figueiredo, P., Elhabiri, M., Saito, N. & Brouillard, R. (1996). Anthocyanin intramolecular interactions. A new mathematical approach to account for the remarkable colorant properties of the pigments extracted from *Matthiola incana*. *Journal of the American Chemical Society*, 118(20), 4788-4793.
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G. & Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur. J. Nutr*(45), 7–18.
- Francis, F. J. (1989). Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 273–314.
- Francis, F. J. (1990). Colour analysis, in: Nielsen N.N., Food Analysis, Aspen Publ., Gaithersburg, MD, USA. 599–612.
- Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E. & Cheynier, V. (2006). Phenolic reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 289-297.
- Giusti, M. M. & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217–225.
- Hager, T. J., Howard, L. R. & Prior, R. L. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(689-695).
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J. & Duan, C.-Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17(2), 1571-1601.
- Hrazdina, G. (1971). Reaction of anthocyanidin-3,5-diglucosides: Formation of 3,5-di-(O- β -D-glucosyl)-7-hydroxycoumarin. *Phytochemistry*, 10, 1125-1130.

- Ifie, I., Marshall, L. J., Ho, P. & Williamson, G. (2016). Hibiscus sabdariffa (Roselle) Extracts and Wine: Phytochemical Profile, Physicochemical Properties and Carbohydrase Inhibition. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64, 4921–4931.
- Ignat, I., Volf, I. & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Ioannou, I., Hafsa, I., Hamdi, S., Charbonnel, C. & Ghoul, M. (2012). Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. *Food Engineering*, 111, 208-217.
- Ismail, A., Ikram, E. H. K. & Nazri, H. S. M. (2008). Roselle (Hibiscus sabdariffa L.) Seeds - Nutritional Composition, Protein Quality and Health Benefits *Food*, 1(2), 1-16.
- Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A. & Speers, R. A. (1987). Anthocyanins as food colorants - a review. *J Food Biochem*, 25, 596-600.
- Jaumot, J., Gargallo, R., de Juan, A. & Tauler, R. (2005). A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 76(1), 101-110.
- Jiang, Y. (2000). Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(3), 305-310.
- Jung, E., Kim, Y. & Joo, N. (2013). Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3769-3776.
- Jurd, L. & Asen, S. (1966). The formation of metal and “co-pigment” complexes of cyanidin 3-glucoside. *Phytochemistry*, 5(6), 1263-1271.
- Kader, F., Irmouli, M., Nicolas, J. & Metche, M. (2002). Involvement of blueberry peroxidase in the mechanisms of anthocyanin degradation in blueberry juice. *Journal of Food Science*, 67(3), 910-915.
- Kader, F., Irmouli, M., Zitouni, N., Nicolas, J.-P. & 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.

- Keppler, K. & Humpf, H. U. (2005). Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg. Med. Chem*, 13(5)195–5205).
- Kerharo, J. & Adam, J. G. (1974). La pharmacopée sénégalaise traditionnelle – Plantes médicinales et toxiques. In, (pp. 315). Paris France: Vigot Frères.
- Kırca, A. & Cemeroglu, B. (2007). Effets of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins *Food chemistry*, 56, 8541-8548.
- Kırca, A. & Cemeroglu, B. (2003). Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chemistry*, 81(4), 583-587.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F. & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923-933.
- Krifi, B., Chouteau, F., Boudrant, J. & Metche, M. (2000). Degradation of anthocyanins from blood orange juices. *J Food Sci Techn*, 35, 275-283.
- Leydet, Y., Gavara, R., Petrov, V., Diniz, A. M., Parola, A. J., Lima, J. C. & Pina, F. (2012). The effect of self-aggregation on the determination of the kinetic and thermodynamic constants of the network of chemical reactions in 3-glucoside anthocyanins. *Phytochemistry*, 83, 125-135.
- Lopes, T. J., Xavier, M. F., Quadri, M. G. N. & Quadri, M. B. (2007). Antocianinas: Uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *R. Bras. Agrociência*, 13(3), 291-297.
- Marco, P. H., Poppi, R. J., Scarminio, I. S. & Tauler, R. (2011). Investigation of the pH effect and UV radiation on kinetic degradation of anthocyanin mixtures extracted from *Hibiscus acetosella*. *Food Chemistry*, 125(3), 1020-1027.
- Março, P. H. & Scarminio, I. S. (2007). Q-mode curve resolution of UV–vis spectra for structural transformation studies of anthocyanins in acidic solutions. *Analytica chimica acta*, 583(1), 138-146.
- Markakis, P., Livingston, G. E. & Fellers, C. R. (1957). Quantitative aspects of strawberry-pigment degradation. *Food Research*(22), 117-130.
- Matsufuji, H., Otsuki, T., Takeda, T., Chino, M. & Takeda, M. (2003). Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 3157–3161.

- Mazza, G. & Brouillard, R. (1987a). Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem*, 25, 207-225.
- Mazza, G. & Brouillard, R. (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, 29(4), 1097–1102.
- Melanie, K., Diana, F., Julia, R., Susanne, S., Anja, N., Sabine, H., Sandra, V., Gudrun, P., Corinna, R. & Doris, M. (2007). Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Mol. Nutr. Food Res*, 51, 1163 – 1172.
- Meschter, E. E. (1953). Effects of carbohydrates and other factors on color loss in strawberry products. *J Agric Food Chem*, 1, 574-579.
- Morton, J. F. (1987). Roselle. In: *Fruits of Warm Climates*, Florida Flair Books, Miami, USA. 281-286
- Mounigan, P. & Badrie, N. (2007). Physicochemical and sensory quality of wines from red sorrel/roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces: effects of pretreatments of pectolase and temperature/time. *Food Sci. Technol*, 42, 469–475.
- Mourtzinou, I., Makris, D. P., Yannakopoulou, K., Kalogeropoulos, N., Michali, I. & Karathanos, V. T. (2008). Thermal stability of anthocyanin extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the presence of β -cyclodextrin. *Agric. Food Chem*, 56, 10303–10310.
- Nebesky, E. A., Esselen, W. B., McConnell, J. E. W. & Fellers, C. R. (1949). Stability of color in fruit juices. *Food Research*, 14, 261–274.
- Nnam, N. & Onyeke, N. (2003). Chemical composition of two varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa* L.), calyces and the drinks made from them. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(3), 1-7.
- Osawa, Y. (1982). Copigmentation of anthocyanins. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis P (ed.), Academic Press Inc., New York, p.41-65.
- Palamidis, N. & Markakis, P. (1978). Stability of grape anthocyanin in carbonated beverages. *Semana Vitivinicola*, 33, 2637-2639.
- Palé, E., Kouda-Bonafos, M. & Nacro, M. (2004). Caractérisation et mesure des activités antiradicalaires d'anthocyanes de plantes du Burkina Faso, C. R. *Chimie*, 7, 973–980.

- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C. & Tiwarib, 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).
- Paul, H. (1995). Hibiscus sabdariffa L. Département de Pharmacie. Paris, Université RENE DESCARTES PARIS V.
- Perron, N. R., Wang, H. C., DeGuire, S. N., Jenkins, M., Lawson, M. & Brumaghim, J. L. (2010). Kinetics of iron oxidation upon polyphenol binding. *Dalton Transactions*, 39(41), 9982-9987.
- Pina, F. (2014). Chemical applications of anthocyanins and related compounds. A source of bioinspiration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 6885-6897.
- Pouget, M. P., Vennat, B., Lejeune, B. & Pourrat, A. (1990). Extraction analysis and study of the stability of Hibiscus anthocyanins, *Lebensm.-Wiss. Technol*, 23, 103–105.
- Rein, M. J. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins (dissertation). EKT series 1331. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology. 88 pp.
- Reyes-Luengas, A., Salinas-Moreno, Y., Ovando-Cruz, M. E., Arteaga-Garibay, R. I. & Martínez-Peña, M. D. (2015). Análisis de ácidos fenólicos y actividad antioxidante de extractos acuosos de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con cálices de colores diversos. *Agrociencia*, 49(3), 277-290.
- Rubinskiene, M., Viskelis, P., Jasutiene, I., Viskeliene, R. & Bobinas, C. (2005). Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food research international*, 38, 867-871.
- Ruckebusch, C. & Blanchet, L. (2013). Multivariate curve resolution: a review of advanced and tailored applications and challenges. *Analytica chimica acta*, 765, 28-36.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C. & Carle, R. (2006). Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *Food Sci*, 71(8), 12-504.
- Sakamura, S. & Obata, Y. (1963). Anthocyanase and Anthocyanins Occurring in Eggplant, *Solanum melongena* L. Part II. Isolation and Identification of Chlorogenic Acid and Related Compounds from Eggplant. *Agricultural and Biological Chemistry*, 27(2), 121-127.

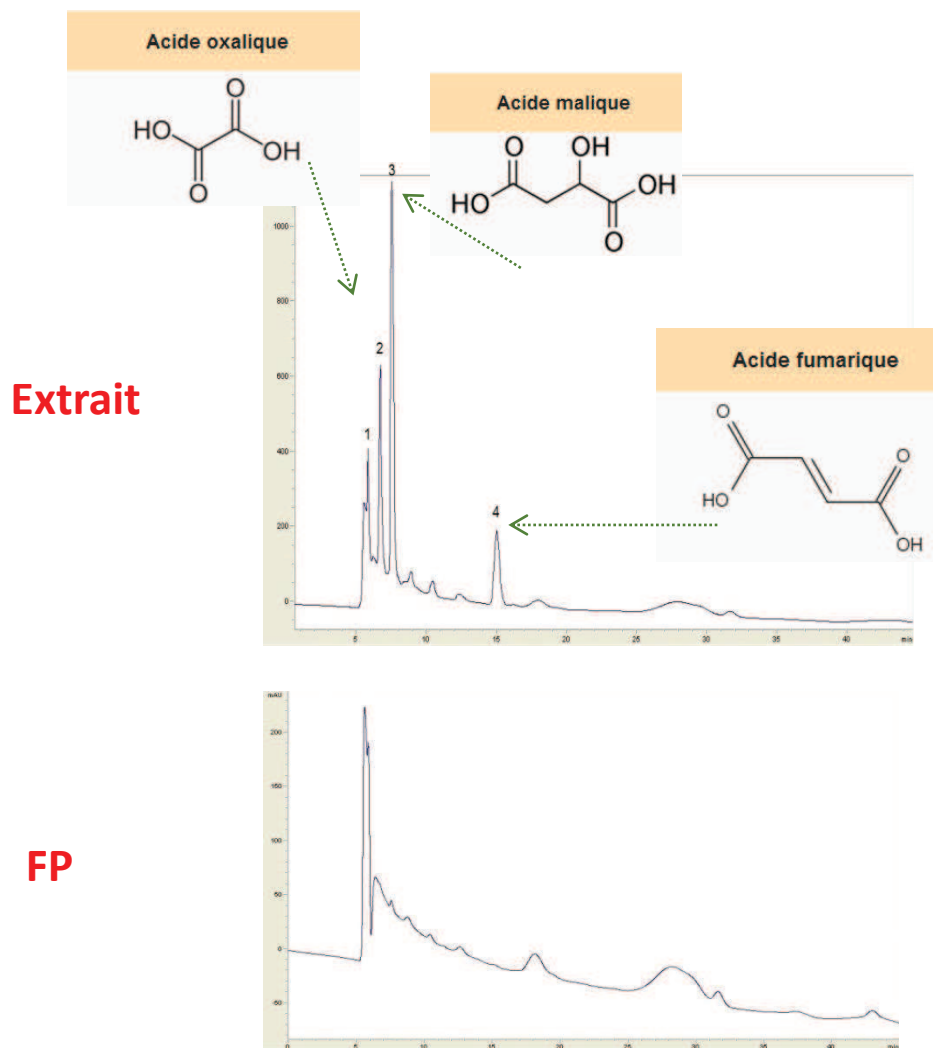
- Salas, E., Fulcrand, H., Meudec, E. & Cheynier, V. (2003). Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7951-7961.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. & Moutonet, M. (1997). Reactions of polyphenoloxidase generated caftaric acid o-quinone with malvidin 3-o-glucoside. *Phytochemistry*, 45(17), 1365-1369.
- Schwarz, M., Wabnitz, T. C. & Winterhalter, P. (2003). Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3682-3687.
- Seeram, N. P., Bourquin, L. D. & Nair, M. G. (2001). Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4924-4929.
- Sindi, H. A., Marshall, L. J. & Morgan, M. R. (2014). Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of Hibiscus sabdariffa. *Food Chemistry*, 164, 23-29.
- Skrede, G., Wrolstad, R. E., Lea, P. & Enersen, G. (1992). Color stability of strawberry and black currant syrups. *Journal of Food Science*, 57, 172-177.
- Starr, M. S. & Francis, F. J. (1968). Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice. *Food Tech*, 22, 1293-1295.
- Starr, M. S. & Francis, F. J. (1974). Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. *J Food Sci*, 38, 1043-1046.
- Stintzing, F. C. & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. *Food Science & Technology*, 15, 19-38.
- Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B. & Wrolstad, R. E. (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6172-6181.
- Sun, J., Bai, W., Zhang, Y., Liao, X. & Hu, X. (2011). Identification of degradation pathways and products of cyanidin-3-sophoroside exposed to pulsed electric field. *Food Chemistry*, 126(3), 1203-1210.
- Surangi, H., Thilakarathna, H. P. & Vasantha, R. (2013). Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients*, 5, 3367-3387.

- Timberlake, C. & Bridle, P. (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27(3), 97-105.
- Timberlake, C. F. & Bridle, P. (1967). Flavylum salts, anthocyanidins and anthocyanins. I.—Structural transformations in acid solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18(10), 473-478.
- Torres, B., Tiwari, B. K., Patras, A., Cullen, P. J., Brunton, N. & O'Donnell, C. P. (2011). Stability of anthocyanins and ascorbic acid of high pressure processed blood orange juice during storage. *Food Science and Emerging Technologies*, 12, 93-97.
- Tsai, P. J. & Huang, H. P. (2004). Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. *Food Research International*, 37(4), 313-318.
- Wang, W.-D. & Xus, S.-Y. (2007). Degradation kinetics of onthocyanins in blackerry juice and concetrate. *Journal of food Engineering*, 82, 271-275.
- Wesche-Ebeling, P. & Montgomery, M. W. (1990). Strawberry polyphenoloxidase: its role in anthocyanin degradation. *Journal of Food Science*, 55(3), 731-734.
- Williamson, G. & Clifford, M. N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity. *J Nutr*, 104 (3), 48-66.
- Wilska-Jeszka, J. (2007). Food colorants. In Z. E. Sikorski (Ed.), *Chemical and functional properties of food components* (pp. 245–274). Boca Raton: CRC Press.
- Wong, P.-K., Yusof, S., Ghazali, H. & Che Man, Y. (2002). Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition & Food Science*, 32(2), 68-73.
- Wrolstad, R. E. (2000). Anthocyanins. In: FJ Francis ,GJ Lauro, editors. *Natural Food Colorants*. Marcel Dekker, Inc., NY. 52-237.
- Yoruk, R. & Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review1. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422.
- Zhao, M., Luo, Y., Li, Y., Liu, X., Wua, J., Liao, X. & Chen, F. (2013). The identification of degradation products and degradation pathway of anthocyanins. *Food Chemistry*, 141, 3260–3267.

ANNEXES

Annexe A

Cromatogramme des acides organiques majoritaires dans l'extrait



Annexe B

Evolution des absorbances à 420 et 520 nm des différentes fractions issues de la chromatographie d'exclusion

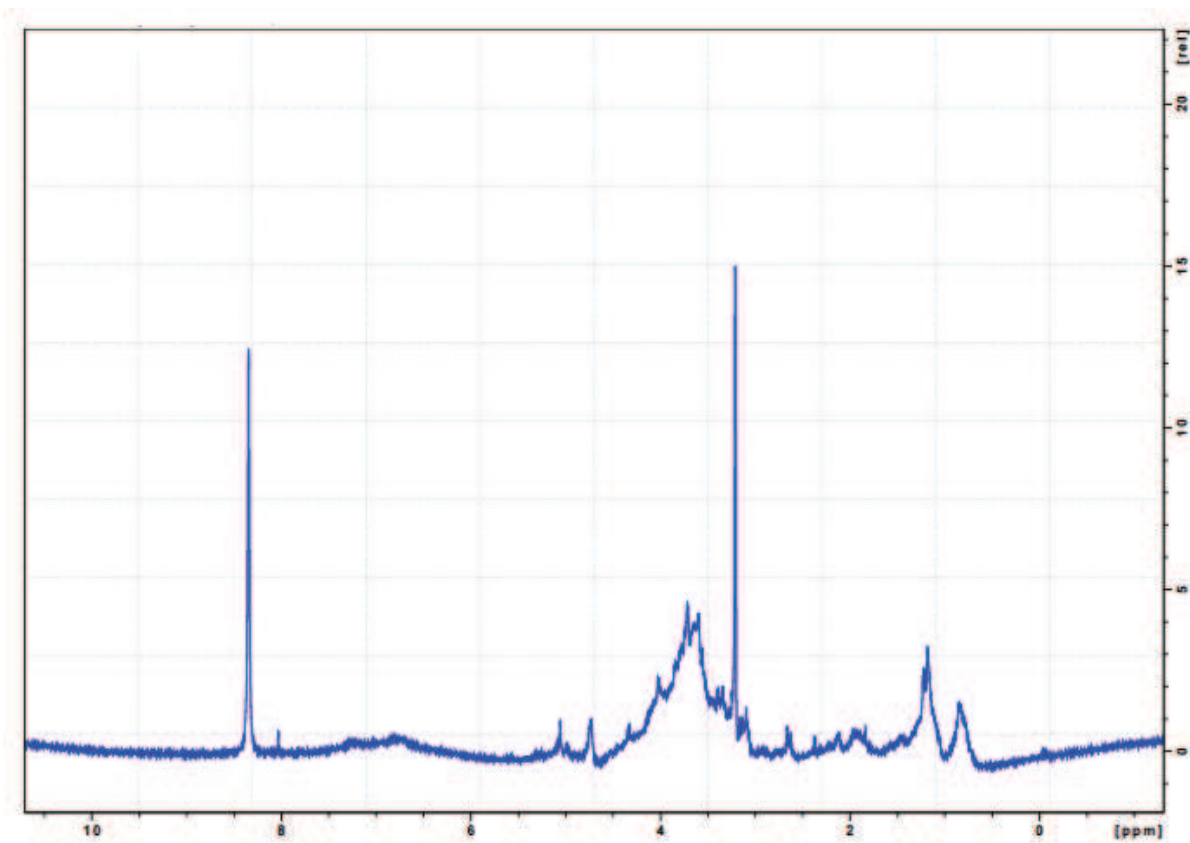
Temps (j)	F1		F2		F3		F4		F5		F6	
	420 nm	520 nm	420 nm	520 nm	420 nm	520 nm	420 nm	520 nm	420 nm	520 nm	420 nm	520 nm
0	0,16	0,23	0,26	0,41	0,78	1,92	0,64	2,73	0,32	1,72	0,06	0,19
4	0,16	0,20	0,20	0,31	0,42	1,22	0,50	2,03	0,34	1,59	0,16	0,80
7	0,22	0,27	0,29	0,41	0,40	0,99	0,50	1,90	0,27	1,08	0,07	0,30
10	0,34	0,42	0,37	0,52	0,46	1,11	0,45	1,67	0,19	0,75	0,05	0,16
16	0,47	0,56	0,33	0,44	0,27	0,45	0,29	0,85	0,25	0,87	0,06	0,26
21	0,50	0,56	0,44	0,52	0,31	0,47	0,26	0,56	0,20	0,49	0,08	0,19
24	0,62	0,69	0,40	0,47	0,26	0,33	0,21	0,39	0,19	0,42	0,11	0,27
35	0,76	0,75	0,47	0,49	0,25	0,30	0,11	0,16	0,09	0,11		
42	0,76	0,71	0,41	0,38	0,24	0,24	0,13	0,15	0,05	0,05		
52	0,92	0,80	0,43	0,36	0,23	0,15	0,12	0,10				
71	1,06	0,85	0,45	0,34	0,26	0,22						

Annexe C

Indice de brun des différentes fractions issues de la chromatographie d'exclusion

temps (j)	F1	F2	F3	F4	F5	F6
0	0,72	0,63	0,30	0,23	0,19	0,33
4	0,78	0,66	0,35	0,25	0,22	0,20
7	0,80	0,71	0,40	0,26	0,25	0,24
10	0,81	0,72	0,41	0,27	0,26	0,30
16	0,84	0,75	0,60	0,34	0,29	0,24
21	0,89	0,84	0,66	0,46	0,40	0,41
24	0,90	0,85	0,80	0,55	0,44	0,41
35	1,01	0,96	0,83	0,69	0,83	-
42	1,07	1,07	0,99	0,92	0,95	-
52	1,14	1,18	-	1,25	-	-
71	1,24	1,33	1,21	-	-	-

Annexe D

Spectre RMN du proton ^1H 

RESUMO

Os cálices secos da flor de *Hibiscus sabdariffa* L. (também conhecida como hibiscus, roseira ou vinagreira azeda) são tradicionalmente usados em África para a fabrico de bebidas por imersão em água. Esta matéria-prima, rica em antocianinas (molécula responsável pela cor vermelha do cálice da flor), é também conhecida na indústria agro-alimentar como fonte de corantes naturais. No entanto, a cor dos extratos obtidos a partir do hibiscus evolui rapidamente (do vermelho vivo ao castanho escuro) ao longo do tempo de conservação à temperatura ambiente, afetando o desenvolvimento de produtos feitos com base nestes extratos. Para melhor caracterizar e compreender a instabilidade da cor, este trabalho centra-se num estudo mecanístico e cinético da degradação das antocianinas durante a conservação de um extracto de hibiscus. A caracterização bioquímica dos extractos permitiu identificar os polifenóis maioritários (delfinidina 3-O-sambubioside (del-3Sb), cianidina 3-O-sambubioside (Cya-3Sb) e ácidos cafeoilquínicos) bem como a presença de metais conhecidos como potenciais catalisadores de reações de oxidação (Fe, Cu, Mn). A cinética de degradação das antocianinas no extrato, que segue um modelo reacional de ordem 1, foi monitorada pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC-DAD) entre 4 e 37 ° C durante 60 dias. A Del-3Sb ($E_a = 90 \text{ kJ mol}^{-1}$) é mais sensível à um aumento de temperatura que a Cya-3Sb ($E_a = 80 \text{ kJ.mol}^{-1}$). A influência de diferentes factores que afectam a degradação das antocianinas foi estudada em soluções modelo (com uma composição simplificada do extrato). A constante de velocidade (k) de degradação da Del-3SB na solução modelo contendo Fe (III), Cu (II) e Mn (II) (concentrações semelhantes às do extracto) foi similar ao da mesma molécula no extrato, enquanto a Cya-3Sb foi 40% menor do que no extrato. O aumento da concentração em Fe de 1 à 13 mg.L^{-1} aumentou cerca de 3 vezes os valores de k de degradação de ambas antocianinas. A adição de ácido clorogénico na solução modelo contendo Fe aumentou 42% no valor de k da Cya-3Sb. Um efeito antagónico é observado no caso de Del-3Sb (47% de redução). O teor de oxigénio dissolvido no extrato não teve qualquer influência sobre a degradação de ambas antocianinas. Dois mecanismos de degradação das antocianinas foram identificados: o mecanismo de cisão, sendo o minoritário (representou apenas 10% de antocianinas degradadas) neste mecanismo as antocianinas se degradam transformando-se em de phloroglucinaldeido, ácido gálico (a partir da Del-3Sb) e ácido protocatecóico (a partir da Cya-3Sb). O outro mecanismo trata-se da condensação das antocianinas com a formação de polímeros castanhos sendo promovida pelo aumento da concentração do Fe e da mistura dos metais Fe, Cu e Mn. As conclusões do presente trabalho levam-nos à perspectivas sobre o estudo do impacto de outros constituintes do extrato (açúcares aminoácidos...) bem como a identificação e quantificação de polímeros acastanhados.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa* L, delfinidina 3-O-sambubioside, cianidina 3-O-sambubioside, cinética, mecanismos de degradação.

RESUME

Les calices séchés d'*Hibiscus sabdariffa* L. sont traditionnellement utilisés en Afrique pour la production de boissons par macération dans l'eau. Cette matière première, riche en anthocyanes, est aussi connue dans l'industrie agro-alimentaire comme source de colorants naturels. Toutefois, la couleur des extraits obtenus évoluent rapidement au cours du temps ce qui nuit au développement de ces produits. Afin de mieux caractériser et de mieux comprendre l'instabilité de la couleur, ce travail propose une étude cinétique et mécanistique de la dégradation des anthocyanes durant la conservation d'un extrait d'*H. sabdariffa*. La caractérisation biochimique de l'extrait a notamment permis d'identifier les polyphénols majoritaires (delphinidine 3-O-sambubioside Del-3Sb, cyanidine 3-O-sambubioside Cya-3Sb, acides caféoylquiniques) et à mis en évidence la présence de métaux connus comme potentiels catalyseurs d'oxydation (Fe, Cu, Mn). Les cinétiques de dégradation des anthocyanes dans l'extrait ont été suivies par CLHP-DAD entre 4 et 37°C pendant 60 j. Elles peuvent être représentées par un modèle d'ordre 1. La Del-3Sb ($E_a = 90 \text{ kJ.mol}^{-1}$) est plus sensible à l'augmentation de la température que la Cya-3Sb ($E_a = 80 \text{ kJ.mol}^{-1}$). L'influence de différents facteurs sur la dégradation des anthocyanes a été étudiée dans des solutions modèles simplifiées. La constante de vitesse de dégradation de la Del-3Sb en solution modèle contenant du Fe (III), Cu (II) et Mn (II) à des concentrations similaires à celles de l'extrait, est proche de celle mesurée dans l'extrait. Celle de la Cya-3Sb est 40 % plus faible que dans l'extrait. L'augmentation de la concentration en Fe de 1 à 13 mg.L⁻¹ multiplie environ 3 fois les vitesses de dégradation des anthocyanes. L'ajout d'acide chlorogénique à une solution modèle contenant du Fe augmente la vitesse de dégradation de la Cya-3Sb de 42 %. Un effet inverse est observé dans le cas de Del-3Sb (diminution de 47%). La teneur en oxygène dissous n'a pas d'influence sur les vitesses de dégradation. Deux mécanismes de dégradation des anthocyanes ont été mis en évidence : le mécanisme de scission, représentant une voie minoritaire (10% des anthocyanes dégradés) avec production de phloroglucinaldéhyde, d'acide gallique (issu de Del-3Sb) et protocatéchique (issu de Cya-3Sb) et un mécanisme de condensation avec formation de polymères bruns qui est favorisé par l'augmentation de la concentration en Fe et le mélange Fe, Cu et Mn. Les conclusions de l'ensemble du travail aboutissent à des perspectives sur l'étude de l'impact d'autres composés présents dans l'extrait (sucres, acides aminés) ainsi que l'identification et la quantification des polymères bruns.

Mots-clés : *Hibiscus sabdariffa* L., delphinidine 3-O-sambubioside, cyanidine 3-O-sambubioside, cinétique, mécanismes de dégradation.

ABSTRACT

Dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. are traditionally used in Africa for beverage production by maceration in water. This raw material, rich in anthocyanins, is also known in the food industry as a source of natural dyes. However, the color of extracts obtained quickly changes over time which affects the development of these products. To better characterize and understand the instability of color, this work provides a mechanistic and kinetic study of the degradation of anthocyanins during the conservation of an extract from *H. sabdariffa*. Biochemical characterization of the extract allowed to identify predominant polyphenols (delphinidin 3-O-sambubioside Del-3Sb, cyanidin 3-O-sambubioside Cya-3Sb and caffeoylquinic acids) and highlighted the presence of metals known as potential oxidation catalysts (Fe, Cu, Mn). Kinetics of degradation of anthocyanins in the extract were followed by HPLC-DAD between 4 and 37 ° C for 60 days. It can be represented by a first order model. Del-3Sb ($E_a = 90 \text{ kJ mol}^{-1}$) is more sensitive to temperature increase than Cya-3Sb ($E_a = 80 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Influence of different factors on the degradation of anthocyanins was studied in simplified model media. Rate constant of degradation (k) of Del-3Sb on model media containing Fe (III), Cu (II) and Mn (II) at similar concentrations to those of the extract was similar to that measured in the extract. For Cya-3Sb it was 40% lower than in the extract. Increasing Fe concentration of 1 to 13 mg.L⁻¹ increased by about 3-fold the k of anthocyanins. Adding chlorogenic acid in a model media containing Fe increased k of Cya-3Sb 42%. Opposite effect was observed for Del-3Sb (47% decrease). Dissolved oxygen content has no influence on k of anthocyanins. Two mechanisms of degradation of anthocyanins have been identified: the scission mechanism, representing a minority pathway (10% of degraded anthocyanins) with production of phloroglucinaldehyde, gallic acid (from Del-3Sb) and protocatechuic (from Cya -3Sb). The other mechanism is condensation with formation of brown polymers, it is promoted by increasing of concentration of Fe was and mixture of Fe, Cu and Mn. Conclusions led to perspectives on study of impact of other compound in the extract (sugar, amino-acids) as well as identification and quantification of brown polymers.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L., delphinidin 3-O-sambubioside, cyanidin 3-O-sambubioside, kinetics, Mechanisms of degradation.