

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1

INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION  
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES  
I.N.A.T.A.A.



N° d'ordre :79/DS/2019

N° de série :05/IN/2019

## Thèse de Doctorat en Sciences Spécialité : Sciences Alimentaires

Présentée par :

**M. Anis CHIKHOUNE**

---

### **Effets des antioxydants naturels issus de *Pituranthos scoparius* et *Hibiscus sabdariffa* sur la stabilité oxydative d'émulsions à base de lactosérum et la cristallisation des lipides**

---

Soutenue le : 02 / 05 / 2019

Devant le Jury composé de :

Président(e) :	<b>Benatallah L.</b>	Pr.	INATAA, UFMC 1, Constantine
Rapporteur :	<b>Boudjellal A.</b>	Pr.	INATAA, UFMC1, Constantine
Examineurs :	<b>Becila-Hioual S.</b>	MCA	ATRBSA, DGRSDT
	<b>Ben-Mahdi M.H.</b>	Pr.	ESSAIA, Alger
	<b>Martini S.</b>	Pr.	DNDFS, USU, USA

*A ceux et celles qui sont toujours de ce monde*

Les mots me semblent peu suffisants, frêles et fugaces pour vous exprimer ma gratitude et mon amour. Il m'est difficile d'adresser à chacun de vous les mots qu'il faut, les mots justes, et ceux qui permettent de parvenir à vos cœurs pour vous dire en toute humilité : merci.

*A ceux et celles qui ne sont plus de ce monde, ceux et celles qui sont partis à jamais*

A vous qui avez gravité autour de moi et m'avez marqué de vos souvenirs doux et indélébiles. Je ne vous oublie pas, vous êtes au plus profond de moi et vous me donnez le courage de me remettre en orbite.

A toi qui est parti sans que je te dise les mots d'amour que je n'ai jamais osé te dire. Je garde mes pépites de souvenirs avec toi dans les tréfonds de mon âme. Mon épopée s'écrira en ton nom et je vivrai des jours meilleurs pour toi.

*« Il y a des êtres ainsi qui laissent en nous comme une poussière d'étoiles qui brillera toujours sur nos souvenirs »*

Amina Mekahli

« Nomade Brûlant »

# Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

## Revue bibliographique

1. Stress oxydant (oxydatif), radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène..... 1

2. Corps gras en alimentation et en technologie agroalimentaire..... 6

2.1. Lipides et corps gras..... 6

2.2. Extraction, raffinage et classification des huiles végétales ..... 7

2.2.1. Extraction et raffinage des huiles végétales ..... 7

2.2.2. Classification des huiles végétales ..... 9

2.3. Emulsions alimentaires ..... 10

3. Oxydation des lipides et impact sur la qualité des produits alimentaires..... 12

4. Métabolites secondaires : diversités structurale et fonctionnelle ..... 13

4.1. Antioxydants endogènes ..... 15

4.2. Antioxydants exogènes ..... 16

4.2.1. Composés phénoliques..... 18

4.3. Caroténoïdes..... 26

4.4. Tocophérols ..... 27

4.5. Phytostérols ..... 28

4.6. Huiles essentielles ..... 29

4.6.1. Terpènes (terpénoïdes) ..... 31

4.6.2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles..... 32

5. Cristallisation des lipides .....	33
5.1. Phénomène de cristallisation et polymorphisme .....	33
5.2. Facteurs influençant la cristallisation et le polymorphisme des lipides .....	36
6. Techniques d'analyse instrumentale d'investigation .....	38
6.1. Extraction des métabolites secondaires des plantes .....	38
6.2. Techniques d'étude des métabolites secondaires .....	40
6.2.1. Techniques spectrophotométriques .....	41
6.2.2. Techniques chromatographiques .....	41
6.2.3. Electrophorèse .....	46
6.2.4. Spectrométrie de masse .....	46
6.2.5. Techniques d'étude et de caractérisation du polymorphisme .....	48
7. Description botanique et synthèse des travaux réalisés sur les plantes étudiées.....	50
7.1. Le Pituranthos à balai ( <i>Pituranthos scoparius</i> ).....	50
7.2. Hibiscus ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ) .....	54

### **Problématique et objectifs de la thèse**

1. Contexte national et international de la thèse.....	56
2. Formulation de la problématique et détermination des objectifs de la thèse .....	57
3. Méthodologie générale de la thèse .....	61

### **Matériels et méthodes**

1. Echantillonnage .....	64
1.1. Pituranthos à balai ( <i>Pituranthos scoparius</i> ) .....	64
1.2. Hibiscus ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> ).....	64
1.3. Extraction des huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> .....	65
1.3.1. Hydrodistillation.....	65

1.3.2. Calcul du rendement d'extraction en huiles essentielles .....	65
1.4. Extraction des composés phénoliques à partir des deux plantes étudiées.....	66
1.4.1. Préparations des extraits aqueux bruts des polyphénols de <i>P. scoparius</i> .....	66
1.4.2. Préparation des extraits bruts polyphénoliques de <i>H. sabdariffa</i> .....	66
1.5. Dosage des polyphénols des extraits de plantes étudiées.....	67
1.5.1. Dosage des polyphénols totaux .....	67
1.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux .....	68
1.5.3. Estimation du pouvoir réducteur .....	68
1.5.4. Dosage des anthocyanines dans les extraits d' <i>H. sabdariffa</i> .....	68
2. Caractérisation chromatographique.....	69
2.1. Caractérisation chromatographique des huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> .....	69
2.1.1. TLC et HPTLC-densitométrie des huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> .....	69
2.1.2. Analyse des composés volatils par MHE-GC-FID-MS .....	70
2.1.3. Analyse GC-MS des huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> obtenues .....	71
2.1.4. Analyse de l'huile essentielle par chromatographie bidimensionnelle GCxGC .....	71
2.1.5. Analyses GC-MS et GCxGC des huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> .....	72
2.2. Analyse chromatographique des extraits polyphénoliques .....	72
2.2.1. Analyse de l'extrait aqueux de <i>P. scoparius</i> par HPLC-DAD-ESI-MS .....	72
2.2.2. Caractérisation par HPTLC des extraits d' <i>H. sabdariffa</i> étudiés.....	73
2.3. Evaluation de l'activité antiradicalaire par la méthode TLC-DPPH' .....	74
2.3.1. Activité antiradicalaire des huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> par TLC-DPPH' .....	74
2.3.2. Activité antiradicalaire des extraits d' <i>H. sabdariffa</i> par HPTLC-DPPH' .....	74
2.4. Analyses chromatographiques des huiles végétales.....	75
2.4.1. Analyse de la composition en acides gras par GC-MS .....	75

2.4.2. Analyse de la composition en triglycérides par LC-MS .....	75
2.4.3. Analyse des tocophérols et phytostérols .....	76
3. Elaboration des émulsions.....	76
3.1. Emulsion formulée à l'échelle laboratoire .....	76
3.2. Emulsion formulée à l'échelle pilote .....	77
4. Analyse des interactions protéine-polyphénols.....	78
4.1. Détermination de la teneur en protéines.....	78
4.2. Interactions protéine-polyphénols dans la phase aqueuse.....	78
4.3. Interactions protéine-polyphénols par LC-ESI-MS/MS .....	78
5. Etude de la stabilité oxydative des émulsions par le test Rancimat .....	79
6. Effets des huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> sur la cristallisation des lipides .....	80
6.1. Evaluation du point de fusion.....	80
6.2. Analyse thermique par calorimétrie différentielle à balayage.....	81
6.3. Détermination du taux de solide (SFC).....	82
6.4. Analyse de la morphologie cristalline .....	82
7. Evaluation sensorielle des émulsions .....	83
8. Analyse statistique.....	83

## **Résultats**

Introduction Publication n°1 .....	85
Résumé Publication n°1 .....	88
Introduction Publication n°2 .....	89
Résumé Publication n°2 .....	93
Introduction Publication n°3 .....	94
Résumé Publication n°3 .....	97

Introduction Publication n°4 .....	98
Résumé Publication n°4 .....	101

### **Discussion générale**

1. Contribution de la spectrophotométrie dans l'évaluation de la teneur en polyphénols .....	102
2. Contribution de la chromatographie dans les analyses fines des échantillons étudiés.....	103
2.1. TLC/HPTLC.....	103
2.2. MHE-GC-MS .....	111
2.3. GCxGC.....	112
2.4. GC-MS .....	114
2.5. HPLC.....	117
2.5.1. HPLC des triglycérides .....	117
2.5.2. HPLC des composés phénoliques .....	118
2.5.3. HPLC des tocophérols et des phytostérols .....	120
3. Contribution de l'électrophorèse et de la chromatographie dans l'étude des interactions protéine-polyphénols .....	121
4. Contribution du test Rancimat dans l'étude de la stabilité oxydative .....	125
5. Contribution des techniques DSC, p-NMR et PLM dans l'étude de la cristallisation des lipides .....	126
5.1. Point de fusion.....	126
5.2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	127
5.3. Taux de solides (SFC) .....	133
5.4. Microscopie à lumière polarisée .....	137
6. Contribution de l'analyse en composantes principales (ACP) dans l'évaluation sensorielle .....	142
Conclusions et perspectives .....	144

Références bibliographiques ..... 146



## Liste des abréviations

- ADN:** acide désoxyribonucléique
- AG:** acides gras
- AGS:** acides gras saturés
- AGMI:** acides gras monoinsaturés
- AGPI:** acides gras polyinsaturés
- AO:** antioxydants
- APCI:** atmospheric pressure chemical ionization
- APPI:** atmospheric pressure photo ionization
- BHA:** butylhydroxyanisole
- BHT:** butylhydroxytoluène
- CCM:** chromatographie sur couche mince
- CE:** communauté européenne
- CoA:** coenzyme A
- DAD:** diode array detector
- DPPH•:** radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
- DSC:** differential scanning calorimetry
- EDTA:** acide éthylènediaminetétraacétique
- ERO:** espèces réactives de l'oxygène
- ERN:** espèces réactives du nitrogène
- ESI:** electrospray ionization
- EsOF:** huile essentielle des fleurs de *P. scoparius*
- EsOS:** huile essentielle des tiges de *P. scoparius*.
- FAB:** fast atom bombardment
- FAME:** fatty acids methyl esters
- FID:** flame ionization detector
- GC:** chromatographie en phase gazeuse
- GSH:** glutathion réduit
- GSHPX:** glutathion peroxydases
- GSSG:** glutathion oxydé
- HPLC:** high performance liquid chromatography
- HPTLC:** high performance thin layer chromatography

**HEs ou EsO:** huiles essentielles

**IUPAC:** international union of pure and applied chemistry

**LDL:** low density lipoproteins

**MALDI:** matrix-assisted laser desorption ionization

**Mix:** mélange des huiles végétales de palme, soja et tournesol

**MS:** mass spectrometry

**NADPH:** cofacteur utilisé comme donneur d'électrons et de protons

**NMR:** nuclear magnetic resonance

**p-NMR:** pulsed nuclear resonance magnetic

**PLM:** polarized light microscopy

**PO:** huile végétale de palme

**RL:** radicaux libres

**SBO:** huile végétale de soja

**SDS:** sodium dodecyl sulfate

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**SFC:** solid fat content

**SFO:** huile végétale de tournesol

**SOD:** superoxyde dismutases

**TAG:** triglycérides ou triacylglycérols

**TBARS:** acide thiobarbiturique

**TLC:** thin layer chromatography

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : origine des différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène .....	4
<b>Figure 2</b> : version simplifiée de l'organisation moléculaire de l'oxygène et ses dérivés .....	5
<b>Figure 3</b> : schéma des différentes classes des corps gras .....	6
<b>Figure 4</b> : opérations unitaires du procédé de trituration des graines oléagineuses .....	7
<b>Figure 5</b> : schéma représentant l'implication des radicaux libres formés lors du processus de l'oxydation des lipides dans les corps gras .....	12
<b>Figure 6</b> : schéma sommaire des voies de biosynthèse des métabolites secondaires issus du métabolisme primaire .....	14
<b>Figure 7</b> : action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants endogènes .....	15
<b>Figure 8</b> : différentes classes des antioxydants naturels endogènes et exogènes .....	16
<b>Figure 9</b> : propriétés et réactivité du groupement phénolique.....	20
<b>Figure 10</b> : structures chimiques et classes des antioxydants exogènes.....	21
<b>Figure 11</b> : quenching des AGPI et piégeage des ERO par l' $\alpha$ -tocophérol .....	27
<b>Figure 12</b> : biosynthèse et propriétés de quelques terpénoïdes connus.....	31
<b>Figure 13</b> : schéma de la cristallisation, des niveaux de structuration moléculaire et des formes polymorphiques des lipides .....	34
<b>Figure 14</b> : schéma d'échantillonnage headspace .....	40
<b>Figure 15</b> : schéma général d'un dispositif-type de chromatographie liquide haute performance .....	43
<b>Figure 16</b> : schéma de base d'un chromatographe .....	44
<b>Figure 17</b> : différentes parties d'un chromatographe bidimensionnel.....	45
<b>Figure 18</b> : photographies du Pituranthos à balai ( <i>P. scoparius</i> ) .....	50
<b>Figure 19</b> : photographies de l'Hibiscus ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	54
<b>Figure 20</b> : distribution géographique de l'Hibiscus dans le monde.....	55

<b>Figure 21</b> : schéma global des différents volets traités et aspects étudiés dans la présente thèse .....	59
<b>Figure 22</b> : schéma de synthèse du design expérimental adopté dans le travail de thèse .....	61
<b>Figure 23</b> : localisation géographique des sites d'échantillonnage de <i>P. scoparius</i> et <i>H. sabdariffa</i> .....	64
<b>Figure 24</b> : schéma de la procédure chromatographique TLC/HPTLC adoptée dans la présente étude .....	69
<b>Figure 25</b> : schéma descriptif du dispositif GC-MS de la présente étude .....	71
<b>Figure 26</b> : schéma descriptif du dispositif HPLC-MS de la présente étude .....	72
<b>Figure 27</b> : schéma fonctionnel de la chaîne pilote .....	77
<b>Figure 28</b> : schéma général de l'étude des interactions protéine-polyphénols.....	78
<b>Figure 29</b> : layout général de la démarche expérimentale et des résultats obtenus ( <b>Publication n°1</b> ).....	87
<b>Figure 30</b> : layout global de la démarche suivie pour l'étude des interactions protéine-polyphénols dans une émulsion type spread .....	92
<b>Figure 31</b> : schéma général de l'incorporation de l'extrait aqueux concentré de <i>P. scoparius</i> dans une émulsion à base de lactosérum type spread .....	96
<b>Figure 32</b> : schéma général de l'étude de l'effet des huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> sur la cristallisation isotherme des lipides.....	100
<b>Figure 33</b> : représentation schématique de l'interaction entre polyphénols (acides <i>p</i> - et <i>o</i> -coumariques) et sites actifs du gel de silice dans le test TLC-DPPH• et mécanisme réactionnel proposé entre le DPPH• et les monoterpènes à doubles liaisons conjuguées.....	110
<b>Figure 34</b> : chromatogrammes GCXGC des huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> .....	113
<b>Figure 35</b> : structures chimiques des composés majoritaires des huiles essentielles de la partie aérienne de <i>P. scoparius</i> caractérisés par GC-MS .....	115
<b>Figure 36</b> : schéma des interactions entre les tanins condensés et les protéines.....	123
<b>Figure 37</b> : courbes de cristallisation isothermes de l'huile de palme avec et sans addition des huiles essentielles des fleurs et des tiges de <i>P. scoparius</i> .....	127
<b>Figure 38</b> : paramètres de cristallisation isotherme et comportement de fusion évalués.....	128
<b>Figure 39</b> : courbes de cristallisation isothermes de Mix avec et sans addition des huiles essentielles des fleurs et des tiges de <i>P. scoparius</i> .....	129

<b>Figure 40</b> : cristallisation isotherme et comportement de fusion de Mix et Mix avec les huiles essentielles étudiées.....	130
<b>Figure 41</b> : micrographes des échantillons PO cristallisés avec et sans les huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> à 20, 21, 22, 23 et 24 °C .....	138
<b>Figure 42</b> : micrographes des échantillons Mix cristallisés avec et sans les huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> à 10, 13, 15, 17 et 20 °C .....	140

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1A</b> : aperçu général des caractéristiques botaniques, géographiques et thérapeutiques du Pituranthos à balai ( <i>P. scoparius</i> ) .....	52
<b>Tableau 1B</b> : synthèse des travaux réalisés sur l'huile essentielle de <i>P. scoparius</i> .....	53
<b>Tableau 1C</b> : synthèse des travaux réalisés sur les différents extraits (aqueux, hydroalcooliques ou organiques) de <i>P. scoparius</i> en Algérie .....	53
<b>Tableau 2A</b> : aperçu général des caractéristiques botaniques, géographiques et thérapeutiques de l'Hibiscus ( <i>H. sabdariffa</i> ).....	55
<b>Tableau 2B</b> : synthèse de quelques travaux traitants diverses potentialités biologiques des différentes parties de la plante <i>H. sabdariffa</i> L. ....	56
<b>Tableau 3</b> : composition en triglycérides (TAGs) des huiles végétales étudiées (SFO, SBO et PO) .....	117
<b>Tableau 4</b> : teneurs en tocophérols et phytostérols des huiles végétales étudiées (SFO, SBO et PO) .....	120
<b>Tableau 5</b> : points de fusion des échantillons étudiés .....	126
<b>Tableau 6</b> : analyse cristalline de PO et Mix avec et sans les EsO étudiées.....	139

« Que mon conte soit beau et se déroule comme un long fil ! »

« Mon conte est un ruisseau, je l'ai conté à des seigneurs »

Tassadit Yacine-Titouh

« Souviens-Toi Ramier... »

# Introduction générale





Les lipides sont des substances grasses qui diffèrent des autres macromolécules par leur composition chimique, structures et fonctions physiologiques et biochimiques (Azimova et Glushenkova, 2012) et leur miscibilité très réduite dans l'eau. Ils peuvent également constituer des émulsions, suspensions d'une phase dans une autre immiscible et dont l'une se présente sous forme de gouttelettes discrètes (phase discontinue) suspendues dans une phase continue. Une couche interfaciale existe entre les deux phases caractérisée par la présence d'un agent tensioactif. Les émulsions eau-dans-huile (water-in-oil W/O) (beurre et margarine) et huile-dans-eau (oil-in-water O/W) (lait, crème, mayonnaise, soupes et sauces) constituent les émulsions classiques. De multiples émulsions (W/O/W et O/W/O) sont possibles et manifestent diverses propriétés (Friberg *et al.*, 2003 ; Herrera, 2012 ; McClements, 2015 ; Leong *et al.*, 2018).

Ces lipides sont sujets à des attaques par des molécules radicalaires. Une large variété de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) peuvent se former dans le corps humain et les systèmes alimentaires. Un radical libre représente une espèce chimique capable d'exister de manière indépendante. Le concept de « stress oxydatif » est longtemps avancé pour relier l'implication de ces espèces dans la genèse des maladies neurodégénératives et le processus de vieillissement. Un équilibre fragile mais harmonieux existe entre les antioxydants (AO) et les radicaux libres (RL). Les AO assurent ainsi un maintien constant et permanent d'un nombre réduit de RL. Les AO obéissent à une règle générale et universelle : leur concentration est faible par rapport au substrat oxydable. Leurs rôles se traduisent à travers le scavenging des ERO, le retardement de leur formation et la réparation des dommages occasionnés (Halliwell, 1991 ; Halliwell, 1992 ; Halliwell *et al.*, 1995 ; Halliwell, 2006 ; Halliwell, 2007).

De ce fait, les réactions radicalaires sont ubiquitaires des systèmes biologiques et alimentaires. Leurs rôles majeurs dans les voies de biosynthèse et la dégradation des aliments sont démontrés (Morello *et al.*, 2002). La peroxydation des lipides est un processus naturel et contrôlé dans plusieurs voies métaboliques permettant par exemple la conversion des acides gras polyinsaturés (AGPI) en prostaglandines et leukotriènes (Gurr, 1999). Les lipides alimentaires ont une tendance naturelle à l'oxydation car constitués par des AGPI à de très fortes teneurs pour certaines huiles (Hamilton et Bhati, 1987). De plus, l'oxydation des lipides des émulsions est différente et plus complexe que celle des huiles végétales (Hu et Jacobsen, 2016). Cette oxydation correspond à l'un des mécanismes les plus importants dans la détérioration des aliments qui engendrent des pertes économiques conséquentes chaque année (Embuscado et Shahidi, 2015). C'est ainsi que l'addition involontaire des antioxydants dans les aliments a été

pratiquée depuis la haute antiquité en Inde, Thaïlande et Chine. L'usage des épices pour la conservation des aliments en est le parfait exemple. Ces antioxydants retardent la rancidité oxydative dans les aliments et protègent les huiles, les graisses et les composés lipophiles (caroténoïdes et vitamines liposolubles) (Pratt et Hudson, 1990 ; Decker *et al.*, 2010 ; Embuscado et Shahidi, 2015). L'application simultanée de plusieurs antioxydants assure un contrôle et une prévention efficaces de l'oxydation (Eskin et Shahidi, 2013). Par ailleurs, l'utilisation des antioxydants synthétiques dans les aliments est strictement régulée par plusieurs pays en raison de leur toxicité potentielle et des risques associés à la santé humaine (Apack *et al.*, 2017). Les polyphénols sont les principaux composés antioxydants des aliments. Si dans les aliments « non gras » les composés antioxydants sont représentés par des polyphénols hydrosolubles, les huiles et graisses végétales sont constituées de monophénols (cas des tocophérols) (Roginsky et Lissi, 2005). Plusieurs de ces polyphénols interagissent avec les protéines alimentaires, notamment celles riches en proline (les caséines). La flexibilité de leur structure secondaire et les nombreuses liaisons hydrogènes contractées sont en faveur des interactions avec les polyphénols (Abdul Hussain *et al.*, 2015). Ces interactions sont d'ailleurs exploitées, en utilisant les protéines laitières comme particules porteuses qui protègent et véhiculent les molécules bioactives (polyphénols et autres antioxydants) (Boland et Singh, 2014).

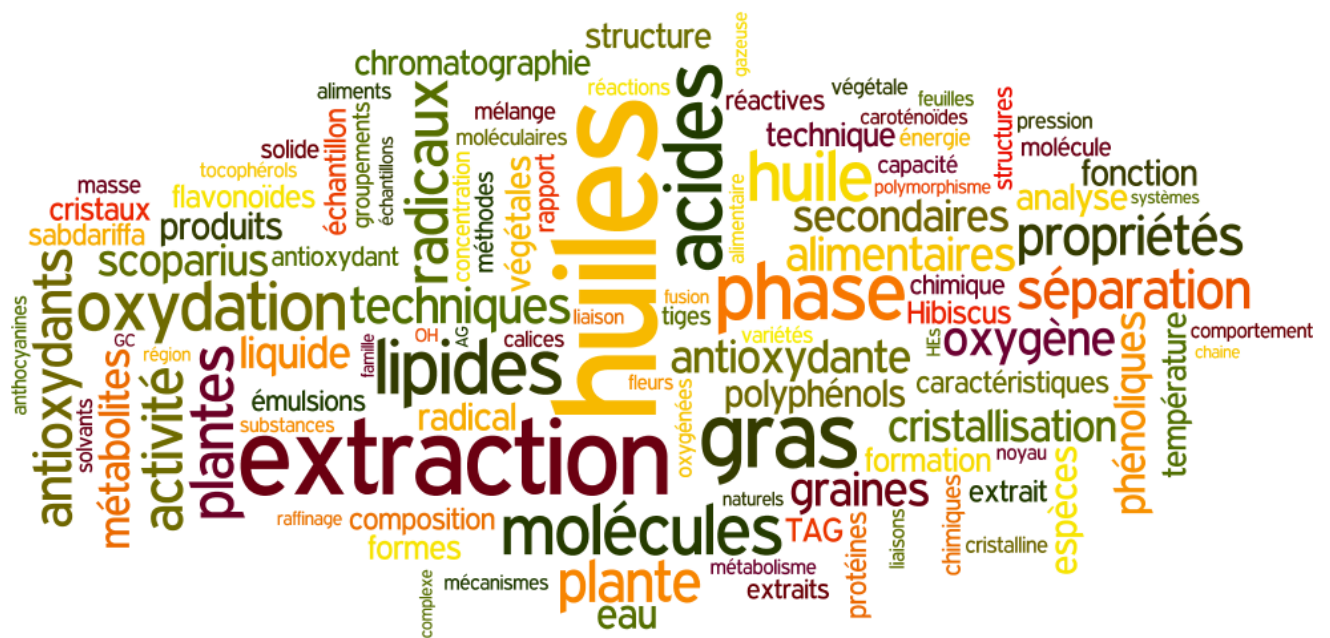
Par ailleurs, les huiles essentielles sont des substances aromatiques à intérêt économique utilisées en industries agroalimentaires (Harborne, 1984) dans la conservation et l'aromatization des aliments. Leur application en qualité d'antioxydants ne cesse de croître dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques. Ces composés bioactifs naturels, isolés à partir de plusieurs plantes aromatiques, ont été largement étudiés pour leurs caractéristiques uniques et importance grandissante dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Agregan *et al.*, 2017 ; Barba *et al.*, 2014 ; Fernandes *et al.*, 2017a ; Fernandes *et al.*, 2017b ; Hachemi *et al.*, 2017a ; Hachemi *et al.*, 2017b ; Hachemi *et al.*, 2018 ; Lorenzo *et al.*, 2018). Leurs procédures d'extraction sont le plus souvent adaptées à partir des pharmacopées (Wagner et Bladt, 1996) et leurs séparations sont nécessaires afin de les caractériser, identifier et quantifier. La spectrophotométrie UV-Vis, les chromatographies couche mince/haute performance (Fried et Sherma, 1996), liquide à haute performance et gazeuse couplées à la spectrométrie de masse (Wixom et Gehrke, 2011). Leurs couplages sont les outils universels de détection des composés actifs à partir des fractions séparées ou non (Görög, 2018).

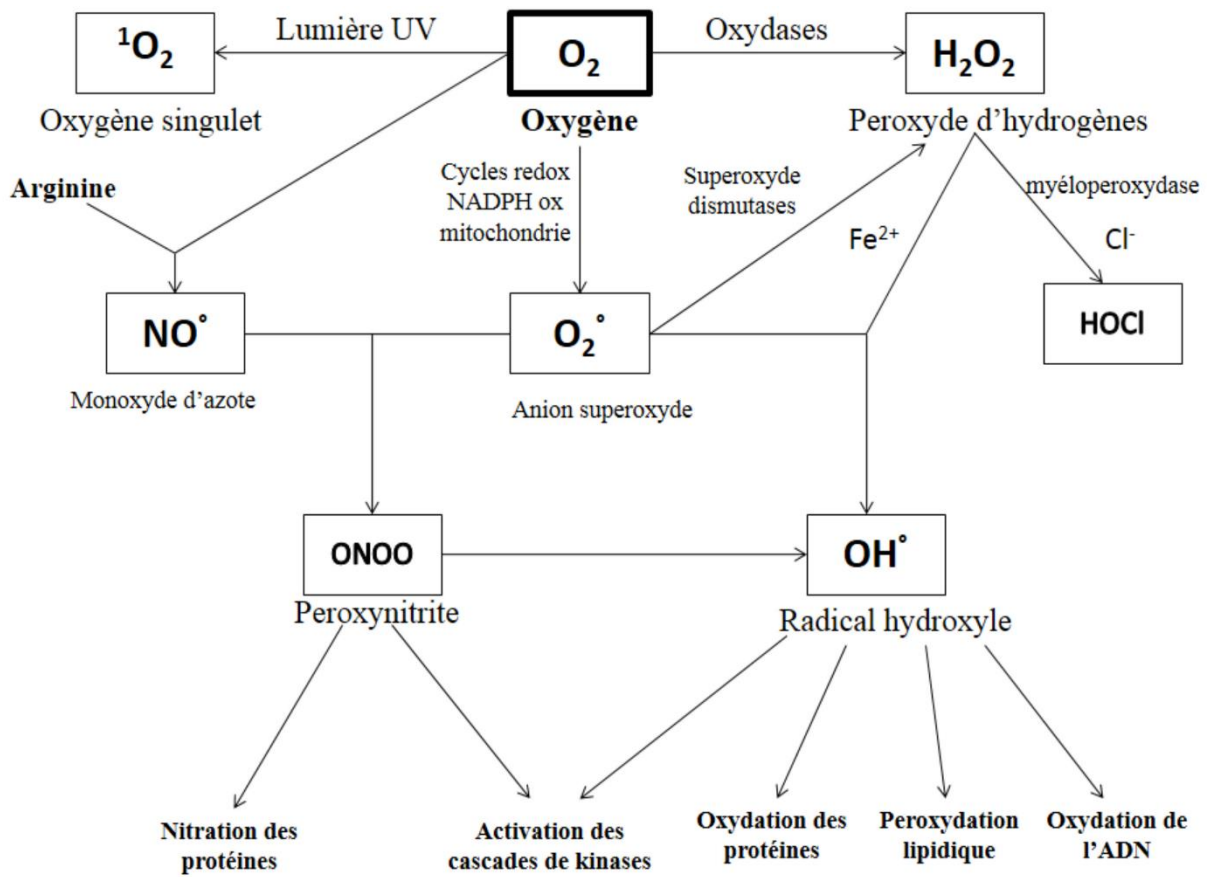
Au regard des huiles végétales, la production mondiale de l'huile de palme a atteint 58,4 millions de tonnes en 2013 contre 30 millions de tonnes en 2004. Elle occupe plus de 34% de la production mondiale des huiles végétales en 2013 (Omar *et al.*, 2015). L'importation des huiles végétales par l'Algérie en 2014 a été estimée à 624667 et 83170 tonnes pour les huiles brutes de soja et tournesol respectivement, alors que les importations des différentes huiles fluides sont passées de 553038 tonnes en 2010 à 715714 tonnes en 2015. La production des graisses (smen et margarines) a été estimée à 142250 tonnes en 2014 contre une consommation des huiles per capita passant de 15,37 à 18,35 kg/personne de 2010 à 2015 (CNIS, 2017). Ces corps gras gouvernent les propriétés macroscopiques et rhéologiques des produits apparentés, via les réseaux cristallins formés par les triglycérides (TAGs). Plusieurs attributs sensoriels tels la tartinabilité, la sensation dans la bouche et la texture dépendent fortement de la force des réseaux cristallins formés (Narine et Marangoni, 1999).

La valorisation du patrimoine végétal local (*Pituranthos scoparius*) ainsi que l'un des déchets de l'agro-industrie laitière (lactosérum) a revêtu une importance capitale dans le présent travail de thèse. La stabilité oxydative d'émulsions formulées à base de lactosérum et incorporées d'antioxydants naturels issus de deux plantes : *Pituranthos scoparius* et *Hibiscus sabdariffa* est au cœur de la présente thèse. Cependant, l'ajout de ces molécules bioactives est-il en mesure d'influer sur : *i*) la résistance à l'oxydation forcée des émulsions étudiées, *ii*) l'établissement de probables liaisons (interactions) entre les macromolécules de la phase aqueuse et ces antioxydants et *iii*) la cristallisation des macromolécules de la phase grasse (comportement thermique et morphologie cristalline).

La présente thèse traite trois grands et principaux axes : *i*) la caractérisation chromatographique des extraits polyphénoliques des deux plantes (*Pituranthos scoparius* et *Hibiscus sabdariffa*) et les huiles essentielles de *P. scoparius*, *ii*) l'effet de ces substances sur la stabilité oxydative d'émulsions formulées à base de lactosérum type spread (échelles laboratoire et pilote) et *iii*) l'effet des huiles essentielles étudiées sur la cristallisation isotherme de l'huile de palme seule et en mélange avec les huiles de soja et tournesol. Les interactions entre les polyphénols des extraits polyphénoliques et les protéines du lactosérum ont été également abordées. Le manuscrit de thèse est scindé en trois grandes parties : 1) une revue bibliographique sur la thématique, avec une synthèse des travaux sur les deux plantes étudiées, 2) la problématique et les différents objectifs visés dans le cadre de la thèse et 3) la présentation des différents résultats sous forme d'articles avec une discussion générale détaillée relatant les débouchés imminents de la thèse. Une conclusion générale et des perspectives sont présentées en fin de manuscrit.

# Revue bibliographique





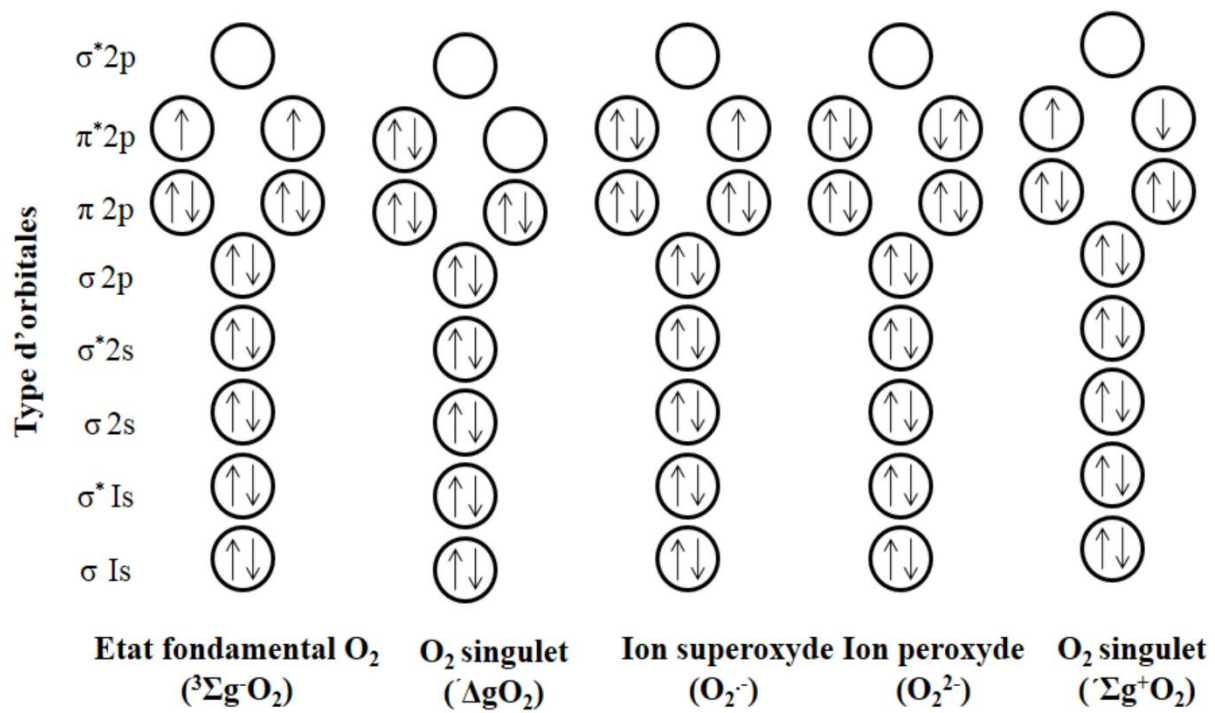
**Figure 1** : origine des différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Favier, 2003).

## **1. Stress oxydant (oxydatif), radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène**

Le stress oxydatif suggère toute condition dans laquelle les molécules oxydantes (radicaux libres) exercent leurs effets toxiques et délétères, pour cause d'une surproduction ou d'altération des mécanismes cellulaires vitaux de protection. Il est la conséquence directe d'un déséquilibre entre les espèces oxygénées réactives et l'activité antioxydante des systèmes de défense endogènes, manifestant un trouble dans le statut d'équilibre des réactions prooxydants/antioxydants dans les organismes vivants et les réactions métaboliques qui dépendent de l'oxygène. Plusieurs auteurs ont impliqué les radicaux et les espèces dérivées de l'oxygène comme principaux agents causaux du vieillissement et plusieurs des maladies humaines dont le cancer, la sclérose multiple, la maladie de Parkinson, les maladies auto-immunes et la démence sénile. En outre, la peroxydation lipidique provoquée par les réactions radicalaires sont incriminées dans le développement de l'athérosclérose (Halliwell et Gutteridge, 1986 ; Halliwell, 1989 ; Ceconi et al, 2003 ; Hussin *et al.*, 2007 ; Valko *et al.*, 2007).

Les radicaux libres de l'oxygène (Figure 1) et du nitrogène, dits aussi espèces réactives de l'oxygène (ERO) et espèces réactives du nitrogène (ERN), sont des produits du métabolisme cellulaire régulier. Ces radicaux sont notamment connus pour jouer des rôles antagonistes: à la fois bénéfique et désavantageux pour les organismes du vivant. La spécificité de ces radicaux réside dans le fait que ces molécules soient hautement réactives. Elles apparaissent dans toutes les formes de vie lors de processus physiopathologiques (Reichl, 2003 ; Valko *et al.*, 2006). Les termes radicaux libres et ERO sont assez souvent considérés comme équivalents. Ces derniers peuvent réagir avec la plupart des biomolécules, initiant une réaction en chaîne de formation de radicaux libres. Pour mettre fin à celle-ci, un radical nouvellement formé doit réagir avec un autre, permettant d'apparier les électrons impairs ou réagir avec un radical libre scavenger (un antioxydant briseur de chaîne ou un antioxydant primaire) (Nordberg et Arner, 2001).

Les radicaux libres intracellulaires identifiés comme étant des molécules à faible poids moléculaires avec un nombre d'électrons impairs, peuvent être également des ERO et *vice versa*. En chimie, on dit que ce sont des molécules qui possèdent un électron non apparié, d'où leur grande instabilité et leur forte réactivité. Ceci s'explique surtout par le fait que les atomes occupent des régions de l'espace moléculaire appelés orbitales. Chaque orbitale peut contenir un maximum de deux électrons qui ont des spins opposés. Dans ce cas précis, un radical peut être toute entité moléculaire pouvant exister de manière indépendante et composé d'un ou plusieurs électrons impairs (un électron impair se trouve seul dans une orbitale



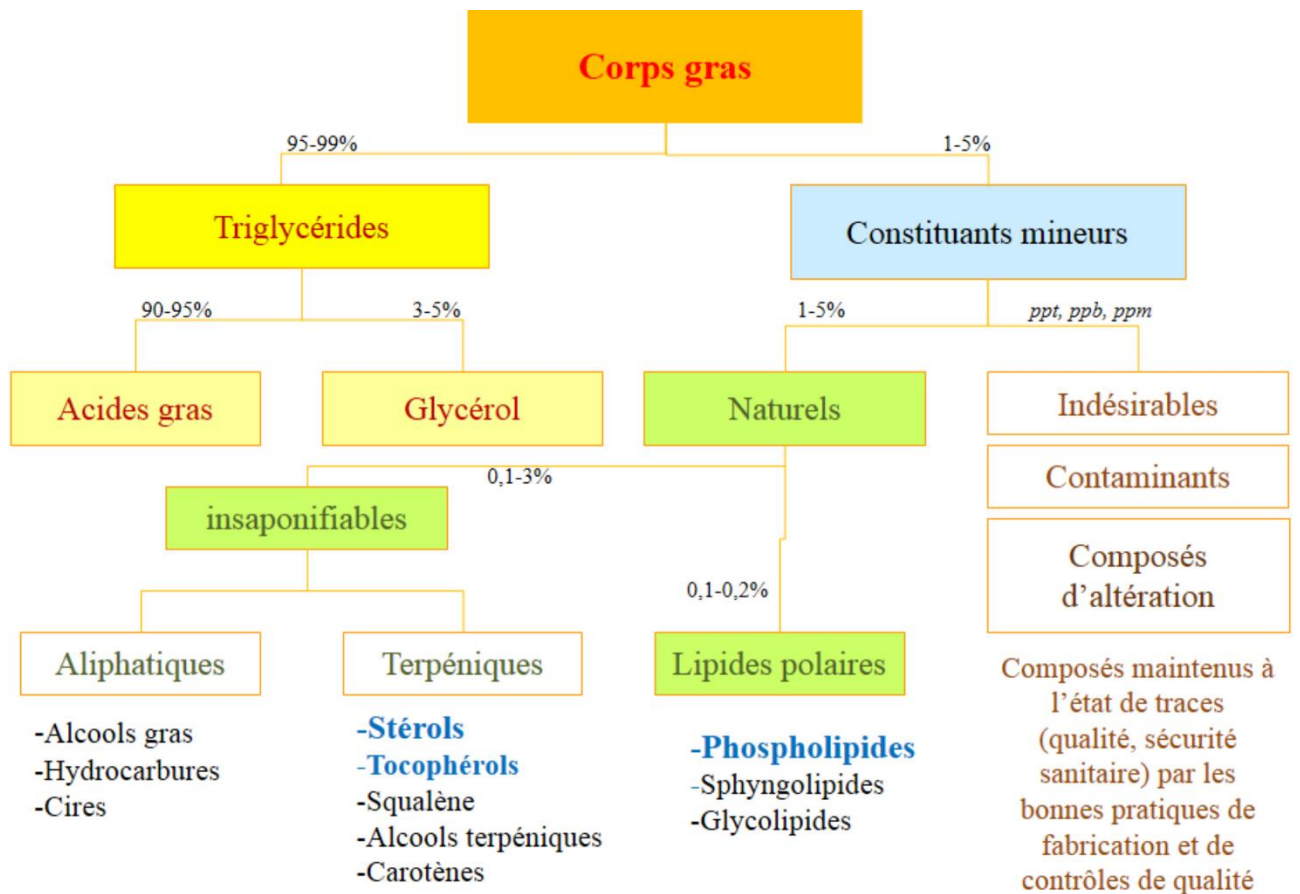
**Figure 2** : version simplifiée de l'organisation moléculaire de l'oxygène et ses dérivés  
(Halliwell, 2006).

électronique). La plupart des biomolécules ne sont pas radicalaires et contiennent uniquement des électrons pairs dans leurs orbitales. Le principal danger des radicaux libres provient des dommages provoqués lors de leur réaction avec des composés cellulaires importants (ADN et membrane cellulaire). L'exposition aux radicaux libres provoque une prolifération et une multiplication anormale des cellules, entraînant des cancers, des dysfonctionnements cellulaires ou la mort des cellules (Halliwell, 1999 ; Pelli et Lyly, 2003, Ré *et al.*, 2005).

L'évolution des processus métaboliques aérobie (respiration et photosynthèse) aboutissent inévitablement à la génération des ERO dans les mitochondries, les chloroplastes et les peroxysomes. L'anion superoxyde (Figure 2) est produit à des concentrations significatives au niveau intracellulaire (cytosol et mitochondrie) par le biais d'enzymes flavines, principalement due à la déperdition d'électrons de la chaîne respiratoire. Deux molécules de superoxyde dismutent rapidement en oxygène et peroxyde d'hydrogène, soit spontanément ou via l'enzyme superoxyde dismutase. Ce dernier permet une circulation des ERO entre les différents compartiments. Le peroxyde d'hydrogène peut être enzymatiquement métabolisé en eau et oxygène par divers systèmes enzymatiques, ou converti en radical hydroxyle extrêmement réactif via une réaction chimique catalysée par des métaux de transition (Nordberg et Arner, 2001). Un trait commun entre ces ERO est leur capacité à causer des dommages oxydatifs irréversibles pour les protéines, les lipides et l'ADN (Apel et Hirt, 2004). Deux mécanismes majeurs pour l'oxydation des macromolécules ont été établis. Le premier se réfère aux radicaux libres de l'oxygène, plus particulièrement le radical hydroxyle (OH•), qui initie l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN. Les réactions de propagation subséquentes oxydent les macromolécules par différentes voies réactionnelles. Le second mécanisme par lequel ces macromolécules sont oxydées implique la production et l'addition de l'oxygène singulet générant ainsi des endoperoxydes. Ce mécanisme requiert un apport en énergie, le plus souvent sous forme lumineuse, pour convertir la molécule de O<sub>2</sub> en oxygène singulet (Miller *et al.*, 1991).

Les radicaux libres les plus connus sont le radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>), le radical hydroxyle (OH•), le monoxyde d'azote (NO•), le radical peroxyde (ROO•) et le radical alcoxyde (RO•). Le radical superoxyde est formé lors de la combustion respiratoire des cellules phagocytaires. La génération de ce radical joue un rôle clé dans la destruction de certaines souches bactériennes par les neutrophiles. Il est hautement réactif dans les milieux hydrophobes, mais très faiblement réactif dans les milieux hydrophiles. Le radical hydroxyle (formé durant la réaction de Fenton)





**Figure 3** : schéma des différentes classes des corps gras (Morin et Pagès-Xatart-Parès, 2012).

ppt : parties par trillions, ppb : parties par billions, ppm : parties par millions.

est si réactif qu'il peut se combiner à son site de formation ou dans un site proche. Il est formé *in vivo* dans des sites spécifiques où les métaux promoteurs des réactions d'oxydation sont localisés. Les autres molécules, telles le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'ion peroxydinitrite (ONOO<sup>-</sup>), acide hypochlorique (HOCl), l'ozone (O<sub>3</sub>) et l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) sont des molécules oxygénées réactives mais non des radicaux libres. Le classement de la réactivité des espèces oxygénées par ordre décroissant est comme suit : le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>), l'oxygène à l'état singulet, l'anion radicalaire superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) et l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Halliwell et Gutteridge, 1986 ; Reichl, 2003 ; Ré *et al.*, 2005).

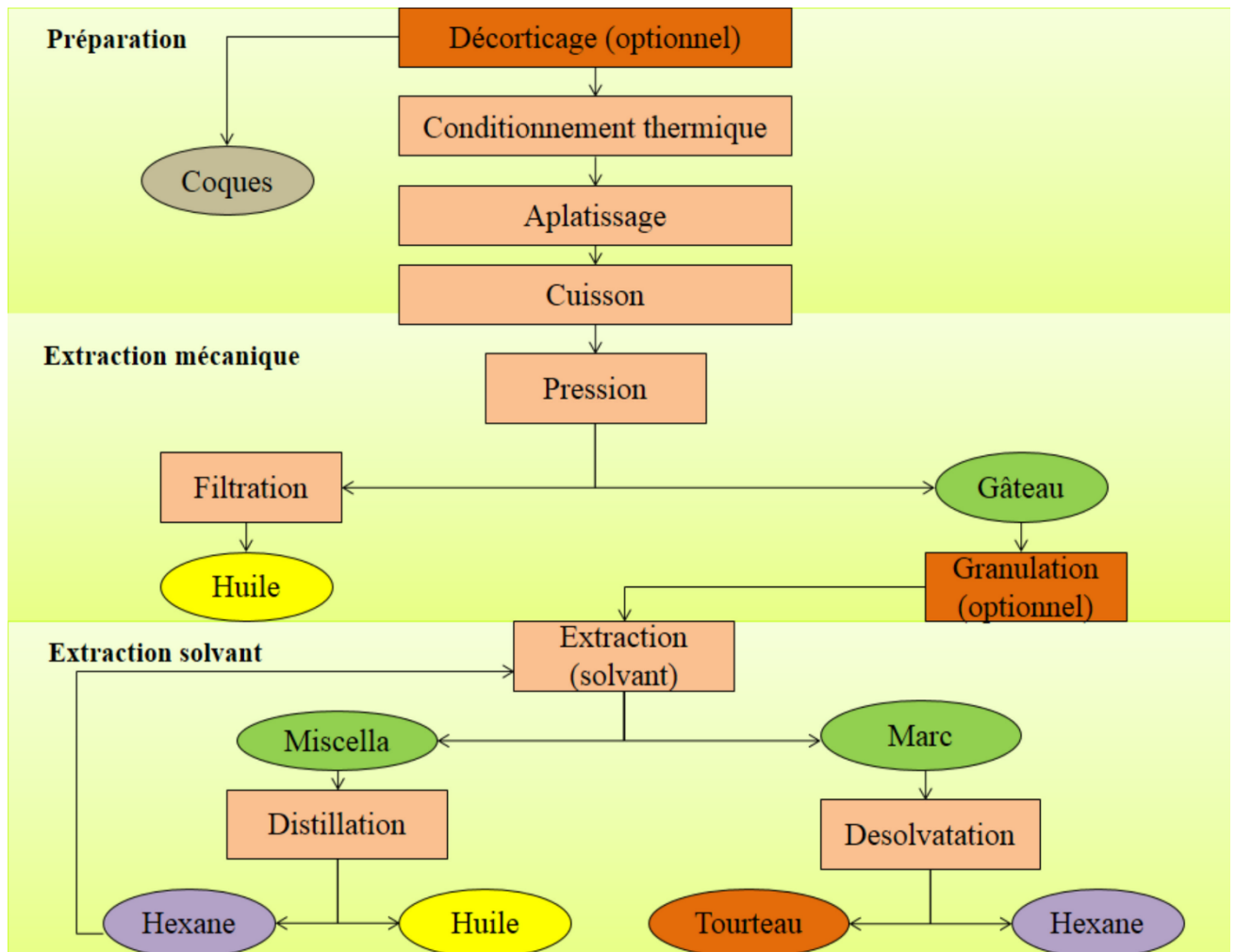
## **2. Corps gras en alimentation et en technologie agroalimentaire**

### **2.1. Lipides et corps gras**

Les lipides, aussi variés soient-ils, ont une propriété commune : la solubilité dans les solvants organiques (benzène, éther, chloroforme, mélange de chloroforme et de méthanol, etc.). Ils sont donc insolubles dans l'eau, d'où leur comportement hydrophobe. Cette propriété a une incidence directe sur leur comportement dans l'organisme (digestion, absorption et transport dans le sang) mais également les procédés de leur transformation en technologie alimentaire (extraction et purification). Les propriétés physiques, chimiques et physiologiques uniques des corps gras leur donnent une place importante en nutrition humaine et en technologie agroalimentaire (Brisson, 1982).

La plupart des lipides de notre alimentation quotidienne sont d'origine végétale et existent sous deux formes qu'on retrouve dans les aliments, naturellement présents ou introduits lors de leur préparation ou consommation. Ils sont appelés corps gras visibles (margarine, beurre, chocolat, huiles et graisses végétales) et invisibles (lait, œufs, cakes, cookies et viennoiseries). Les lipides d'origine végétale constituent le noyau de notre existence (Siret, 2004 ; Weselake, 2007). En Figure 3 un schéma panoramique sommaire des différentes classes de lipides rencontrés dans la nature. Les triglycérides (TAG) sont les composés majoritaires des corps gras et sont composés d'acides gras et de glycérol. Des constituants mineurs non glycériques sont également présents, ayant une incidence importante en technologie des corps gras mais aussi en santé humaine (Morin et Pagès-Xatart-Parès, 2012).

Les acides gras (AG) sont prépondérants dans une panoplie de produits d'origines animale et végétale. Les acides laurique (C12 :0), palmitique (C16 :0) et stéarique sont parmi les AG saturés largement rencontrés, alors que l'acide oléique (C18 :1) et dans une moindre mesure l'acide plamitoléique (C16 :1) sont les acides gras monoinsaturés les plus fréquents. Les AG



**Figure 4 :** opérations unitaires du procédé de trituration des graines oléagineuses (Fine *et al.*, 2013).

polyinsaturés les plus répandus sont surtout l'acide linoléique (C18 :2) et l'acide linoléique (C18 :3). Les TAG sont des esters d'acides gras et de glycérol. Ils sont considérés comme étant une forme de stockage de l'énergie assez courante dans le règne animal (cytoplasme des adipocytes) (Cuvelier *et al.*, 2004).

Depuis des millénaires, les graisses et huiles végétales ont été obtenues à partir de graines et fruits oléagineux, de noix, de la plante elle-même et de tissus gras animaux. Elles sont pressées à partir du végétal de départ et sont, dans de nombreuses situations, raffinées à des fins alimentaires (fritures, assaisonnements, formulation de matières grasses tartinables et margarines), mais aussi pour les industries des cosmétiques et des lubrifiants (Akoh et Min, 2002 ; Foster *et al.*, 2009). Celles-ci constituent la source la plus importante de lipides dans un régime alimentaire sain (Flickinger et Huth, 2004). Ces huiles et graisses sont constituées de TAG, dont les caractéristiques dépendent de leur composition en acides gras (Salas *et al.*, 2009).

Les graisses et les huiles végétales, issues des graines et fruits oléagineux, représentent une famille très vaste des corps gras et rentrent dans les préparations culinaires les plus diverses (huiles de table, huiles et graisses de fritures). Elles sont considérées comme ingrédients principaux des margarines et des shortenings, sont exclusivement lipidiques (100 % de lipides), hautement énergétiques (900 Kcal/100 g) et ne contenant pas d'eau, contrairement aux autres corps gras (beurre, margarine, crème fraîche, saindoux et suif) (Cheftel et Cheftel, 1977 ; Lecerf, 2011). Les huiles végétales jouent un double rôle : nutritionnel (acides gras essentiels et vitamines liposolubles) et hédonique (sapidité et saveur, onctuosité, texture et satiété) (Lecerf, 2011 ; O'Brien, 2009).

## **2.2. Extraction, raffinage et classification des huiles végétales**

### **2.2.1. Extraction et raffinage des huiles végétales**

Les procédés d'extraction des huiles végétales à partir des graines oléagineuses (Figure 4) sont identifiés au nombre de trois : la pression unique ou double, l'extraction par solvant et le procédé mixte (pressage couplé à l'utilisation d'un solvant d'extraction sur le tourteau) (Gunstone, 2007).

Le pressage est un procédé physique qui est réalisé par une séparation solide-liquide et conduit à l'exsudation de l'huile sous l'effet de la force de compression exercée sur les graines (Schwartzberg, 1997). Le procédé industriel d'extraction des huiles végétales issues des graines et de fruits oléagineux dit trituration, correspond à l'ensemble des opérations unitaires

(opérations mécaniques et/ou chimiques) qui aboutissent au déshuilage, à l'optimisation du rendement d'extraction et l'amélioration de la qualité de l'huile à obtenir. Les huiles vierges sont celles obtenues exclusivement par des opérations mécaniques (pression) et peuvent subir de suite un raffinage partiel (désodorisation) ou total (huiles de pression raffinées) (Morin et Pagès-Xatart-Parès, 2012). L'huile vierge est un produit naturel, de couleur et de flaveur caractéristiques du fruit ou de la graine dont elle est extraite, alors que l'huile raffinée possède des qualités organoleptiques modifiées (flaveur neutre et coloration peu intense) (Cahuzac-Picaud, 2010).

La trituration des graines oléagineuses au niveau des industries des corps gras produit deux types d'huiles brutes : les huiles de pression et les huiles d'extraction. Celles-ci sont généralement mélangées et ne peuvent être utilisées en l'état pour la consommation qu'après un raffinage (Ervard *et al.*, 2007).

Le mélange de l'huile de pression et celle d'extraction, dit huile brute, est sujet à un raffinage total ou partiel qui permet l'élimination des impuretés, d'éventuels contaminants et assurer des qualités physico-chimiques et organoleptiques adaptées à la consommation (Fine *et al.*, 2013).

L'extraction des huiles aboutit à l'obtention de lipides d'une pureté allant jusqu'à 95%, le pourcentage de 5% restant de cet extrait brut riche en lipides représente des impuretés qui rendent l'huile obtenue particulièrement sensible à l'oxydation. Celle-ci doit être ainsi nettoyée et débarrassée de ces impuretés. Ce procédé de nettoyage de l'huile végétale est communément appelé raffinage (Parmentier *et al.*, 2004).

Le raffinage d'un corps gras (huile ou graisse) met en œuvre des étapes ayant chacune un objectif en particulier. Le raffinage peut être physique ou chimique. Dans le raffinage chimique, des solutions basiques (soude) sont utilisées pour éliminer les acides gras libres, les phospholipides et les autres contaminants de la matière première ou substances indésirables (gommes, cires, pigments, traces métalliques et composés volatils odorants) durant l'étape de neutralisation, alors que dans le raffinage physique les acides gras libres sont éliminés à haute température. Le raffinage doit permettre le contrôle de la formation de composés indésirables via les réactions d'oxydation, d'hydrolyse ou d'isomérisation. Il a pour but ultime le maintien et l'amélioration des caractères organoleptiques et nutritionnels et assure la stabilité du corps gras traité (Pages-Xatart-Parès, 2008 ; Pages-Xatart-Parès *et al.*, 2010). Les huiles issues des deux types de raffinage sont utilisées dans diverses applications alimentaires, soit en l'état

comme huiles d'assaisonnement ou huiles de friture, soit émulsionnées dans des émulsions (mayonnaises, margarines) (Hui *et al.*, 2006).

### **2.2.2. Classification des huiles végétales**

Plusieurs classifications pour les huiles végétales sont rapportées (un des exemples est fourni en Figure 3). Les critères de classification prennent en compte divers aspects reliés à la source, la composition et le mode d'obtention de celles-ci.

Les huiles végétales peuvent être classées selon leur source originale d'extraction, dont celles issues de fruits oléagineux (huile de palme, huile de palmiste ou amande de noix de palme, huile de coprah ou huile de coco et huile d'olive), de graines oléagineuses (huile de soja et huile de colza) et de sous-produits céréaliers et fibres alimentaires (huile de germe de maïs et huile de coton). Elles peuvent être classées aussi selon leur composition en AG dont les huiles lauriques (coprah et palmiste), huiles palmitiques (huile de palme et huile de coton), huiles oléiques/linoléiques (les huiles de tournesol, sésame, carthame et arachide), huiles oléiques (huile d'olive), huiles linoléiques (les huiles de lin, canola, soja et beurre de cacao) et les huiles éruciques (huile de colza) (Gunstone, 2008).

Elles peuvent aussi être classées selon la teneur et la composition en AG en huiles à acides gras saturés (AGS), monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI). Celles-ci sont à leur tour subdivisées en sous-groupes. Les huiles à AGS renferment *i*) le sous-groupe de l'acide caprique (huile de Cuphea), *ii*) sous-groupe des acides laurique et myristique (huile de noix de coco et huile de palmiste), *iii*) sous-groupe de l'acide palmitique (huile de palme, huile de noix pili) et *iv*) le sous-groupe de l'acide stéarique (beurre de cacao, beurre de karité et huile d'amande de mangue). Les huiles à AGMI regroupent *i*) le sous-groupe des AGMI (les huiles d'olive, de noisettes, de noix de macadamia, de crambe, d'avocat, de noyau d'abricot, de colza et de moutarde blanche) et *ii*) le sous-groupe AGMI + AGS + acide linoléique (les huiles d'arachide, d'avoine, de sarrasin, de pistache, de son de riz et d'argan). Le groupe des AGPI comprend *i*) le sous-groupe de l'acide linoléique (les huiles de pépin de raisins, d'onagre, de pépin de melon, de carthame, de salicorne et de cassis), *ii*) sous-groupe de l'acide linoléique + AGS (les huiles de graines de coton, de cumin noir, de pépin de pastèque, d'amarante, de noix et de lupin), *iii*) le sous-groupe de l'acide linoléique + des AGMI (les huiles de tournesol, de maïs, de germe de blé, de cumin, de sésame, de bourrache, de soja et de chanvre), *iv*) le sous-groupe de l'acide  $\alpha$ -linoléique + AGMI (les huiles de cameline, de lin et de périlla) et *v*) le sous-groupe de l'acide

$\alpha$ -linoléique + acide linoléique (les huiles de pourpier, de chia, de graines d'argousier et de salicorne) (Dubois *et al.*, 2008).

La classification des huiles végétales selon leur mode d'obtention implique généralement trois formes : les huiles vierges, les huiles brutes et les huiles raffinées (Severac, 2010).

### **2.3. Emulsions alimentaires**

Une émulsion est composée de deux liquides immiscibles ; le plus souvent de l'eau et de l'huile, dont l'un des deux liquides est dispersé sous forme de petites gouttelettes sphériques dans l'autre. Les émulsions sont classées en fonction de la distribution spatiale de la phase huileuse (phase grasse) et de la phase aqueuse (eau). Lorsque les gouttelettes de l'huile sont dispersées dans une phase aqueuse, l'émulsion est dite huile dans eau (H/E) ou oil-in-water (O/W) (lait, crème, dressings, mayonnaise, boissons lactées, soupes et sauces). Tandis que la dispersion des gouttelettes d'eau dans une phase huileuse (grasse) est dite émulsion eau dans l'huile (E/H) ou water-in-oil (W/O) (margarine et beurre). La phase sous forme de gouttelettes est dite phase dispersée, discontinue ou phase interne, alors que la phase qui entoure cette phase dispersée est dite dispersante, discontinue ou externe. La taille des gouttelettes de la phase dispersée d'une émulsion est généralement comprise dans un intervalle de 0,1 à 100  $\mu\text{m}$ . Les émulsions alimentaires montrent différentes caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques en termes d'apparence (fluides, crémeuses, gélifiées), arôme, texture, goût et durée de conservation. Elles ont en commun l'aspect blanc opaque (Brochette, 1999 ; McClements, 1999 ; McClements, 2004).

Les émulsions sont du point de vue thermodynamique considérées comme étant des systèmes instables, car une énergie libre positive importante est requise pour augmenter la surface entre les deux phases grasse et aqueuse. En outre, cette instabilité est augmentée par la différence des densités de l'huile et de l'eau. Pour cette raison, les émulsions se séparent en une couche d'huile située en haut d'une couche d'eau, la première étant de densité inférieure par rapport à la seconde, ce qui tend à minimiser la surface de contact entre les deux phases (McClements et Decker, 2000). L'instabilité des émulsions a une conséquence directe sur leur comportement rhéologique durant leur déformation ou même dans le temps. Le vieillissement des émulsions provoque également le changement du comportement rhéologique, par l'installation des phénomènes d'agrégation et de coalescence (Derkach, 2009).

Les émulsions alimentaires sont, de par leur nature, de composition complexe. Les gouttelettes qui les forment sont stabilisées par des protéines, de petites molécules de surfactants (émulsifiants) et dans certains cas des polysaccharides (hydrocolloïdes) (Dickinson, 2010).

Les émulsions alimentaires peuvent exister sous diverses formes telles les margarines. Au sens réglementaire, elles sont composées d'au moins 80% de matière grasse. Les produits commercialisés sont en effet pour la plupart des matières grasses tartinables ou 'spreads', allégées ou non en matière grasse suite aux efforts des industriels pour réduire la teneur des lipides dans leurs produits. Les spreads ou matières grasses tartinables sont utilisés pour un usage en tartine ou fondus sur les aliments en substitution principalement du beurre, ou encore en remplacement de l'huile ou du beurre. Elles sont définies par le règlement (CE) no 2991/94 du 5 décembre 1994, établissant des normes pour les matières grasses tartinables. Ce règlement fixe des normes pour les matières grasses laitières, les matières grasses végétales et les matières grasses composées de produits végétaux et/ou animaux dont la teneur en matières grasses est au minimum de 10 % et inférieure à 90 % du poids et qui sont destinées à la consommation humaine (Saillard, 2010).

La phase aqueuse de ces émulsions contient des ingrédients hydrosolubles comme le lait, l'eau ou encore un sous-produit que les fromageries modernes et industries des caséines produisent: le lactosérum, considéré depuis longtemps comme un déchet et récemment mis au goût du jour (Smithers, 2008). Ayant comme origine le lait des mammifères, il est considéré comme un liquide dilué contenant 6% de solides totaux, représenté principalement par le lactose (70%) et les protéines du lactosérum (0-7%) (Zall, 1992). Les principales activités biologiques des protéines et peptides ayant pour origine les sécrétions mammaires ont été rapportés (Schanbacher *et al.*, 1997). Une revue de littérature scientifique exhaustive a fourni une multitude de preuves quant à l'efficacité des protéines laitières à réguler les fonctions physiologiques spécifiques dans des expérimentations animale et humaine (Korhonen et Pihlanto, 2006). Au-delà de la nutrition de base, il y a de nombreuses preuves du potentiel des protéines de lactosérum et des peptides agissant en qualité d'ingrédients fonctionnels (Onwulata et Huth, 2009). Les protéines majoritaires du lactosérum sont la  $\beta$ -lactoglobulines ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La) et l'albumine du sérum bovin (ASB ou en encore bovin serum albumin, BSA). Ces protéines contiennent tous les acides aminés indispensables et surpassent les autres protéines en qualité, appuyant leur impact positif et leurs bénéfices santé (Keri Marshall, 2004 ; Madureira *et al.*, 2007). Les protéines du lactosérum montrent également des caractéristiques



fonctionnelles uniques telles que propriétés gélifiantes, épaississantes (Bryant et McClements, 1998), émulsifiantes et moussantes (Herceg *et al.*, 2007 ; Farrag, 2008).

La fabrication d'une émulsion alimentaire avec des attributs de qualité dépend de la sélection des matières premières appropriées (eau, huile, émulsifiants, agents épaississants, minéraux, acides, bases, vitamines, colorants) et des conditions des procédés employés (blendage, homogénéisation, pasteurisation et stérilisation) (McClements, 1999).

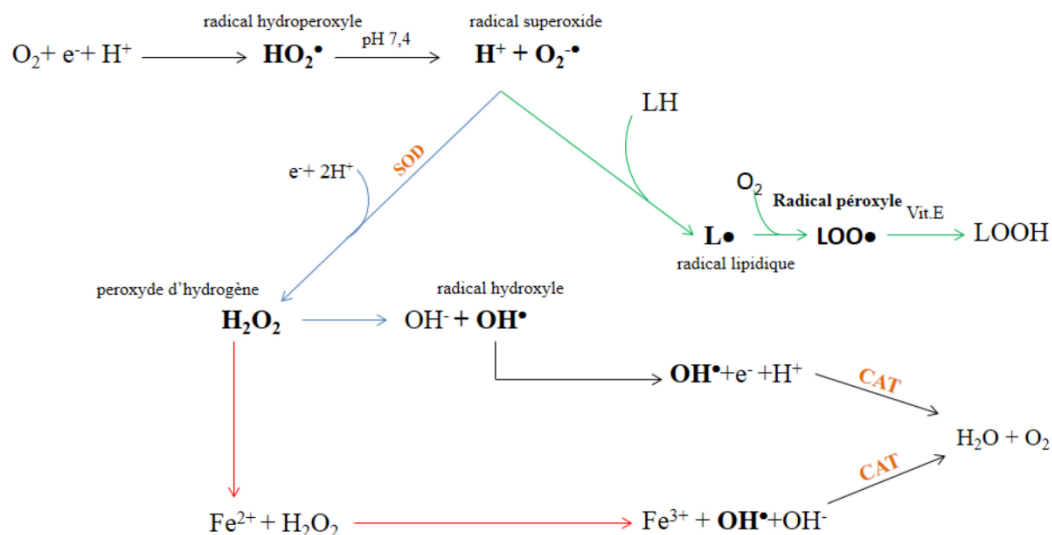
L'émulsification est un procédé qui permet de disperser un fluide dans un autre, qui est supposé être immiscible, via la création d'une interface. Les propriétés des émulsions alimentaires ainsi que leurs utilisations industrielles sont gouvernées non seulement par des variables comme la température et la composition de l'émulsion, mais aussi la distribution de la taille des gouttelettes (Leal-Calderon *et al.*, 2007).

Le processus d'émulsification peut-être subdivisé en trois classes : *i*) la première classe étant les méthodes conventionnelles comprenant l'agitation, l'homogénéisation, l'ultrasonication et la microfluidisation, *ii*) la seconde classe comprend deux technologies: l'émulsification membranaire (obtention d'émulsions doubles, de phases à fines gouttelettes et des microcapsules) et *iii*) l'émulsification par formation d'un micro-tunnel. La troisième classe étant l'inversion (Lillford et Aguilera, 2007 ; Charcosset, 2009).

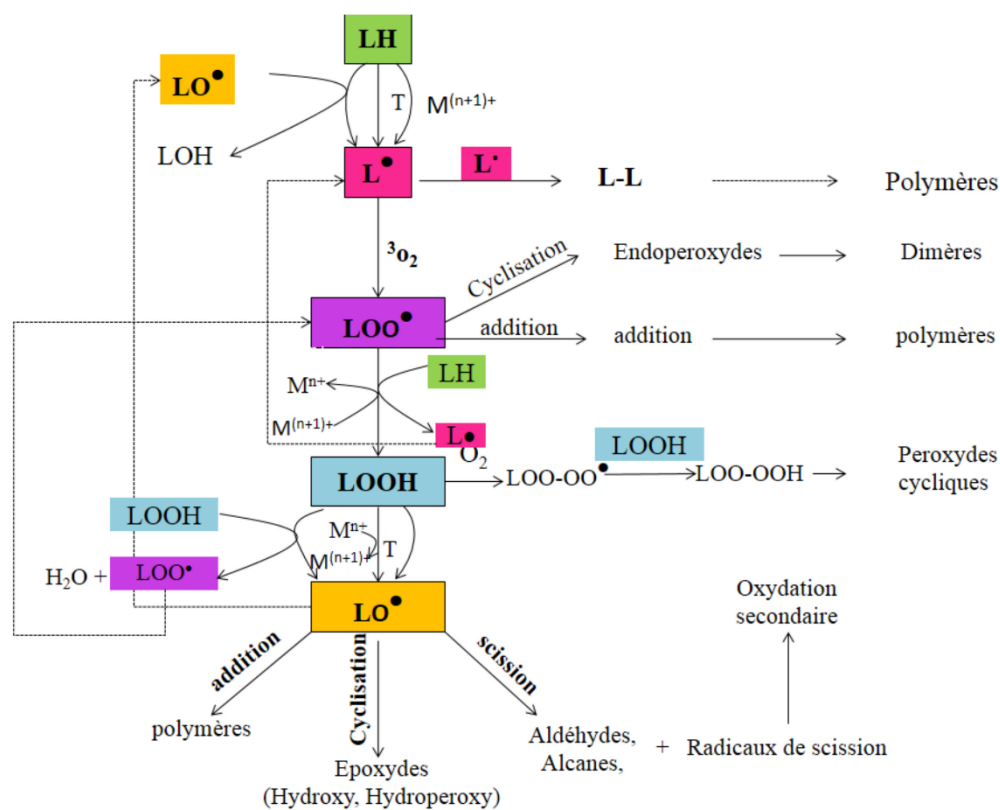
### **3. Oxydation des lipides et impact sur la qualité des produits alimentaires**

L'oxydation des lipides dans les aliments est une préoccupation qui ne cesse de se poser chez les professionnels de l'agroalimentaire. Elle a un effet désavantageux sur les propriétés de l'aliment dont sa conservation, palatabilité, fonctionnalité et qualité nutritionnelle (Hidalgo *et al.*, 2006).

En chimie quantique, l'oxygène triplet est une molécule diatomique qui possède deux électrons impairs de valence. Cette configuration électronique représente l'état énergétique le plus bas. Quand cette molécule d'oxygène absorbe suffisamment d'énergie (via une réaction physique ou chimique), un des électrons impairs de celle-ci passe à un niveau énergétique plus élevé et l'électron devient de suite excité. Une molécule d'oxygène singulet est par conséquent produite et atteignant un état d'excitation (Figure 2). L'oxygène singulet est un état énergétique instable de la molécule d'oxygène à cause de l'excès d'énergie acquis. Cet état lui permet de réagir avec d'autres molécules, dont les acides gras insaturés à doubles liaisons (Figure 5A) afin de



(A)



(B)

**Figure 5** : schéma représentant (A) l'implication des radicaux libres formés (B) lors du processus de l'oxydation des lipides dans les corps gras. LH : acide gras insaturé ; L $\bullet$  : radical lipidique, LO $\bullet$  et LOO $\bullet$  : radicaux peroxydes ; LOOH : hydroperoxyde ; T : température, M $^{n+}$  et M $^{(n+1)+}$  : ions métalliques ; SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase (Eymard, 2003 ; Carocho et Ferreira, 2013).

libérer son excès d'énergie. L'oxydation s'effectue également avec la molécule d'oxygène à l'état triplet, mais la réactivité de l'oxygène singulet est significativement plus élevée. A titre d'exemple, l'oxygène singulet réagit 1450 fois plus rapidement avec l'acide linoléique que la réaction de l'oxygène triplet avec ce dernier. Cet oxygène singulet est considéré comme l'agent d'oxydation majeur incriminé dans la rancidité des huiles de consommation alimentaire durant leur stockage, exportation et transformation (Halliwell *et al.*, 1995 ; St Angello, 1996 ; Yuan, 2007).

Il en ressort de ce fait que le phénomène d'oxydation est initié dans les lipides insaturés, reconnus comme substrats préférentiels de l'oxygène. Bien que l'oxydation des acides gras libres soit plus rapide que celle des triglycérides (d'où un rôle crucial de la lipolyse dans l'accélération du processus de l'oxydation), c'est surtout le degré d'insaturation qui rend les lipides insaturés plus sensibles que d'autres. Ceci n'empêche pas leurs homologues saturés à subir l'oxydation lorsqu'ils sont soumis à de hautes températures (Jeantet *et al.*, 2008 ; Lorient, 1998). Cette oxydation des lipides peut s'effectuer selon plusieurs mécanismes en fonction des agents initiateurs (catalyseurs) impliqués et du milieu réactionnel: l'auto-oxydation (température, ions métalliques, radicaux libres), photo-oxydation (photosensibilisateurs) et oxydation enzymatique (lipoxygénase, cyclooxygénase) (Jentet *et al.*, 2008).

Il est communément admis que les réactions dans les systèmes alimentaires, dont la médiation est assurée par la molécule d'oxygène, sont identifiées comme étant des réactions d'auto-oxydation (Figure 5B) et donnant lieu à trois étapes principales : initiation (ou amorçage), propagation et terminaison. La température élevée, la lumière et les traces métalliques influencent considérablement cette étape, où des hydroperoxydes sont formés. Lors de la propagation, des isomères d'hydroperoxydes sont formés. La décomposition des hydroperoxydes (produits issus de la première étape) donne lieu à des produits volatils à odeur désagréable (produits secondaires d'oxydation). L'étape de terminaison est caractérisée par la formation d'espèces non radicalaires à partir d'espèces radicalaires, mettant fin à la réaction en chaîne d'oxydation. Ces espèces peuvent donner naissance à d'autres produits secondaires par décomposition (St Angello, 1996 ; Cillard et Cillard, 2006 ; Villière et Génot, 2006). Un schéma général de l'oxydation des lipides et des produits issus de leur dégradation est présenté en Figure 5B.

L'oxydation des lipides conduit, comme évoqué précédemment, à la formation d'hydroperoxydes, molécules très instables qui se décomposent rapidement pour former une

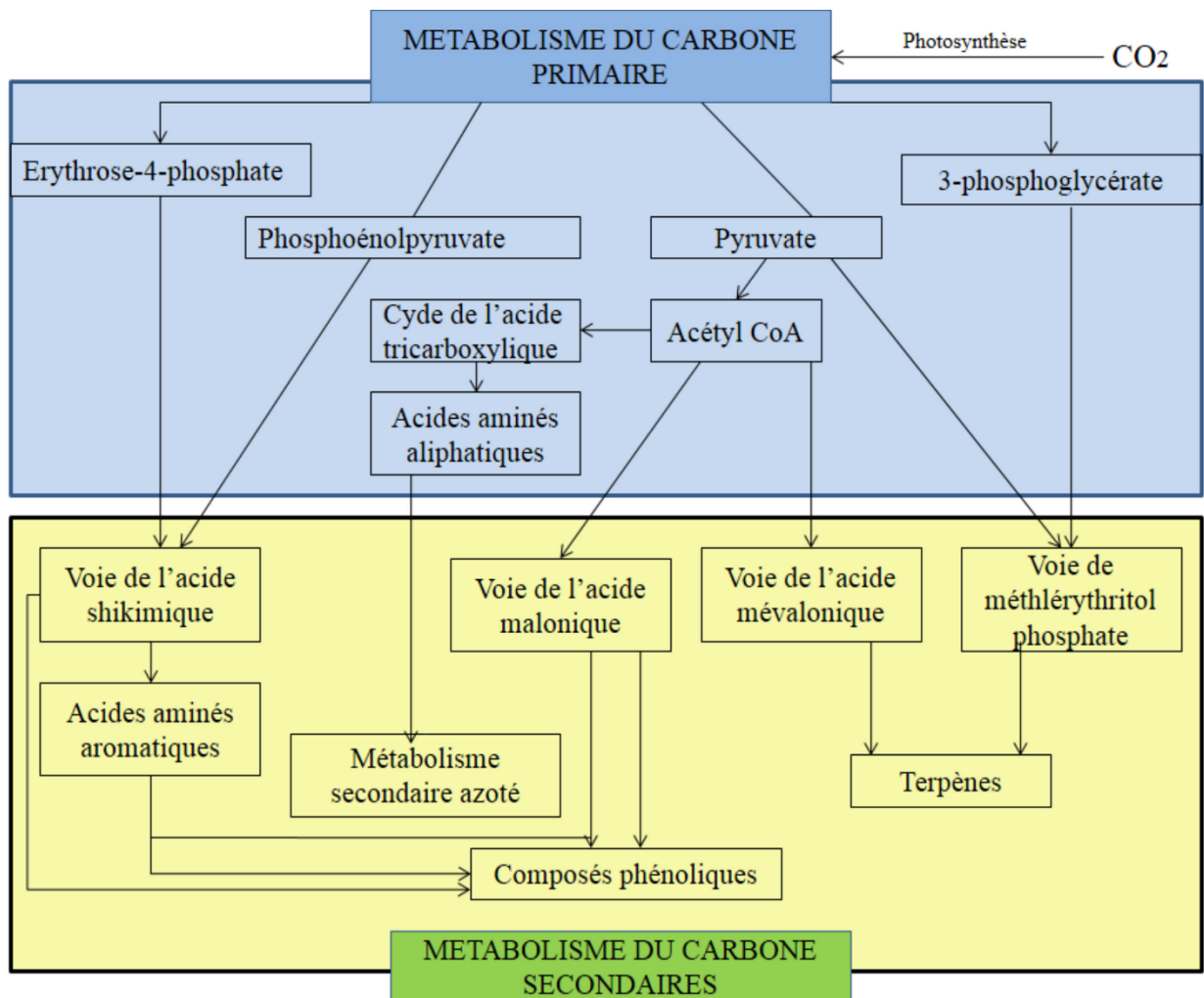
centaine de produits secondaires dont les structures chimiques sont si variées et incluent les aldéhydes, les cétones, les alcools, les acides et les hydrocarbures. Ces molécules sont responsables d'odeurs et de saveurs désagréables connues sous le terme générique de « rancidité ». Celles-ci peuvent être détectées dès les premiers stades de l'oxydation, car étant de faible poids moléculaires et donc facilement volatiles. L'hexanal a été identifié comme étant l'un des composés responsables de l'odeur de rance perçue lors de l'oxydation (Labuza et Dugan, 1971 ; St Angelo, 1996 ; Wheatley, 2000).

Le mécanisme de l'oxydation des lipides dans les émulsions huile-dans-eau (O/W) diffère de celui des huiles non émulsionnées, car ces émulsions contiennent une phase aqueuse qui contient à la fois des prooxydants et des antioxydants. S'ajoute à cela la présence d'une interface huile-eau dont l'impact des interactions entre l'huile et les composantes de la phase aqueuse est non négligeable (Frankel *et al.*, 1994 ; McClements et Decker, 2000). Cependant, il a été suggéré que l'oxydation des lipides au niveau des émulsions eau-dans-huile (W/O) s'opère de la même manière que pour les huiles non émulsionnées. Néanmoins, il est probable que les mécanismes d'oxydation en surface puissent jouer un rôle dans les phénomènes d'oxydation pour ces émulsions. Les réactions d'oxydation altèrent la structure physique des émulsions (changement de la tension interfaciale) et causent des dommages oxydatifs aux protéines à l'interface, ce qui peut conduire à un changement des propriétés physiques et contribuer à l'instabilité des émulsions (Coupland et McClements, 1996).

L'oxydation des lipides dans les émulsions se met en place rapidement, à cause d'une large surface de contact qui facilite les interactions entre les lipides et les prooxydants hydrosolubles tels les ions des métaux de transition (Waraho *et al.*, 2011). Il est bien établi que l'oxydation des lipides est affectée par la température, la concentration de l'oxygène, les photosensibilisateurs et la concentration des prooxydants (hydroperoxydes et ions des métaux de transition). A côté de ces facteurs, d'autres peuvent influencer significativement l'oxydation des lipides dans les émulsions en raison de leur composition assez complexe dont : ingrédients de l'émulsion, composition interfaciale (type et concentration de l'émulsifiant), charge de surface, pH de l'émulsion, viscosité et conditions opératoires (McClements, 2004 ; McClements, 2005).

#### **4. Métabolites secondaires : diversités structurale et fonctionnelle**

La vie des humains est profondément dépendante des plantes. En plus des nutriments de base (protéines, lipides et sucres), les plantes sont une source qui regorge de molécules à intérêts

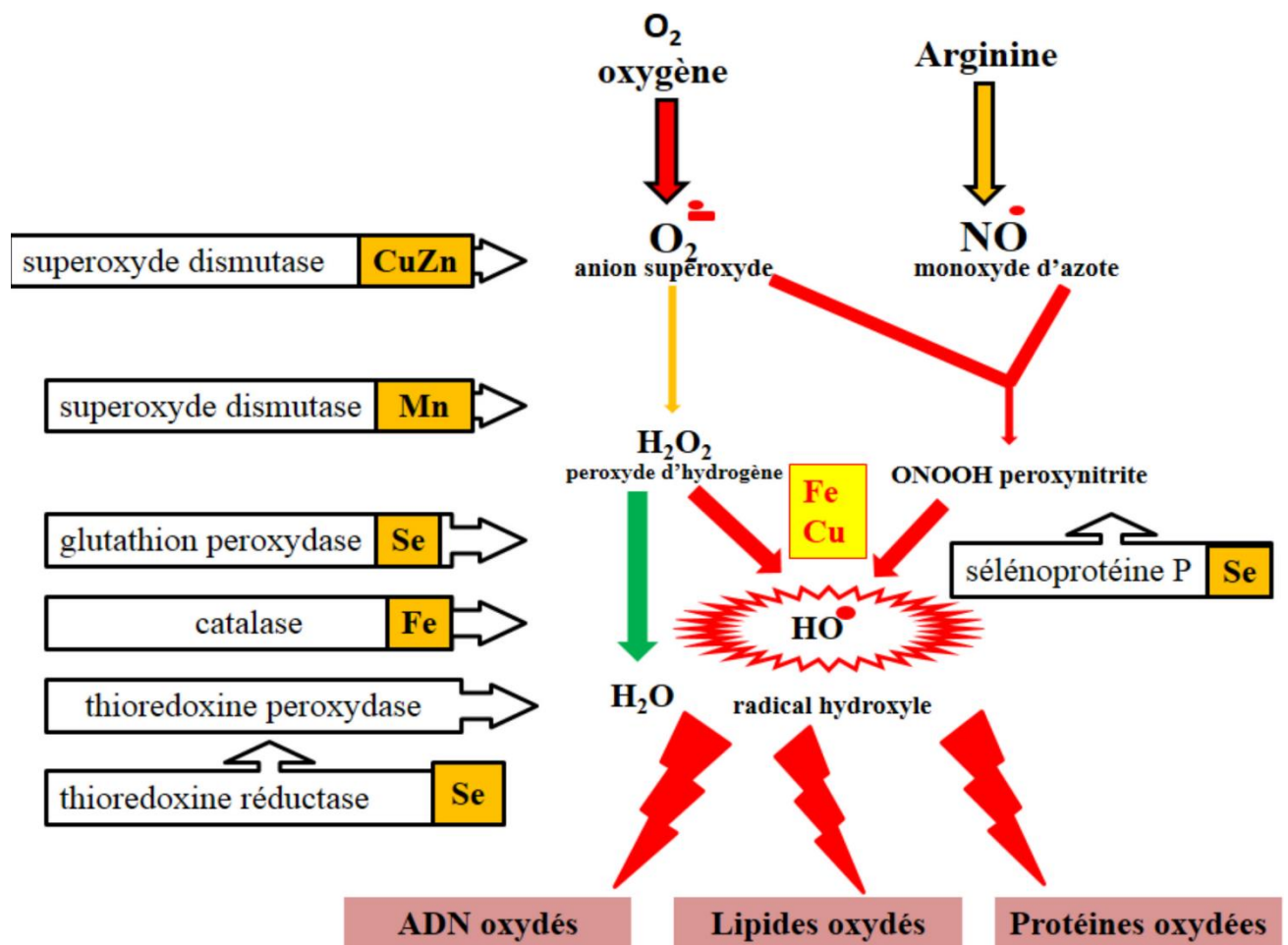


**Figure 6 :** schéma sommaire des voies de biosynthèse des métabolites secondaires issus du métabolisme primaire (Grigoras, 2012). CoA : coenzyme A.

pharmaceutique, cosmétique, alimentaire mais aussi du bois, de la cellulose, des insecticides et des pigments. Dans ce contexte, le règne végétal a le potentiel d'être la meilleure usine non polluante qui puisse exister. L'industrie chimique s'efforce tant bien que mal de synthétiser ces substances, mais d'un succès très limité. De ce fait, le métabolisme secondaire contribue fortement à l'importance économique des plantes. Cependant, malgré les avancées enregistrées dans le domaine de la biotechnologie végétale et qui concernent la synthèse de métabolites utiles, les seuils de production restent modestes et ne suffisent pas pour atteindre des applications industrielles de grande envergure (Vasconsuelo et Boland, 2007).

Les métabolites secondaires sont présents dans tous les végétaux supérieurs, le plus souvent avec une grande diversité structurale. La règle générale veut qu'un seul groupe de métabolites secondaire domine dans un taxon donné. Quelques composés majoritaires sont souvent associés à plusieurs composés dérivés et mineurs. Dans l'ensemble, le profil des métabolites secondaires dans une plante donnée est complexe, change dans un tissu ou organe de manière spécifique et les changements peuvent être constatés lors des différents stades de développement (les organes les plus importants pour la survie et les organes reproducteurs ont les concentrations les plus élevées en métabolites secondaires), entre individus et entre populations (Wink, 2003). La capacité des plantes à réaliser *in vivo* de la chimie combinatoire en mélangeant, rassemblant, changeant et développant les gènes des produits requis pour les voies de biosynthèse des métabolites secondaires, créant par conséquent un pool illimité de composés chimiques, que l'homme ne cesse d'exploiter. Les propriétés médicinales des métabolites secondaires sont mises au premier plan des bénéfices recherchés (Ncube *et al.*, 2012).

Les plantes synthétisent une myriade de métabolites secondaires qui sont dérivés généralement du métabolisme central ou primaire (Figure 6). Ces métabolites secondaires totalisent plus de 200,000 structures chimiques définies à ce jour, avec surtout des avancées fulgurantes dans la compréhension de la régulation des flux métaboliques entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire dans les plantes. La différenciation du métabolisme secondaire, du point de vue de la nomenclature, par rapport au métabolisme primaire ou central était déjà perçue dès la seconde moitié du 19<sup>e</sup> siècle. Le métabolisme primaire permet à la plante d'utiliser l'eau, le dioxyde de carbone et les sels minéraux pour synthétiser les métabolites primaires (sucres, acides gras, acides aminés et acides nucléiques) requis pour la formation et le maintien des cellules vivantes. Par contre, le métabolisme secondaire donne lieu à des métabolites qui assurent les interactions entre les plantes et leur environnement (composés de défense contre les insectes et les pathogènes, attracteurs des pollinisateurs, agents allélochimiques contre les



**Figure 7 :** action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants endogènes (Favier, 2003). Mn : manganèse, Se : sélénium, Fe : fer, Zn : zinc.

compétiteurs). Les métabolites secondaires dits aussi « produits secondaires ou secondary products », « molécules phytochimiques ou phytochemicals » ou encore « métabolites spécialisés ou specialized metabolites » sont les synonymes directs de « produits naturels » (natural products en anglais), terme plus répandus chez les chimistes et plus particulièrement les phytochimistes. Ces composés déterminent la flaveur et le goût des végétaux, pouvant avoir des effets bénéfiques ou néfastes sur la santé humaine et animale lors de l'ingestion, mais offrent également une base solide pour la recherche en pharmaceutique. (Hartmann, 2007 ; Aharoni et Galili, 2011 ; Kroymann, 2011 ; Kliebenstein et Osbourn, 2012). Un schéma sommaire des principales voies de biosynthèse des métabolites secondaires est présenté en Figure 6.

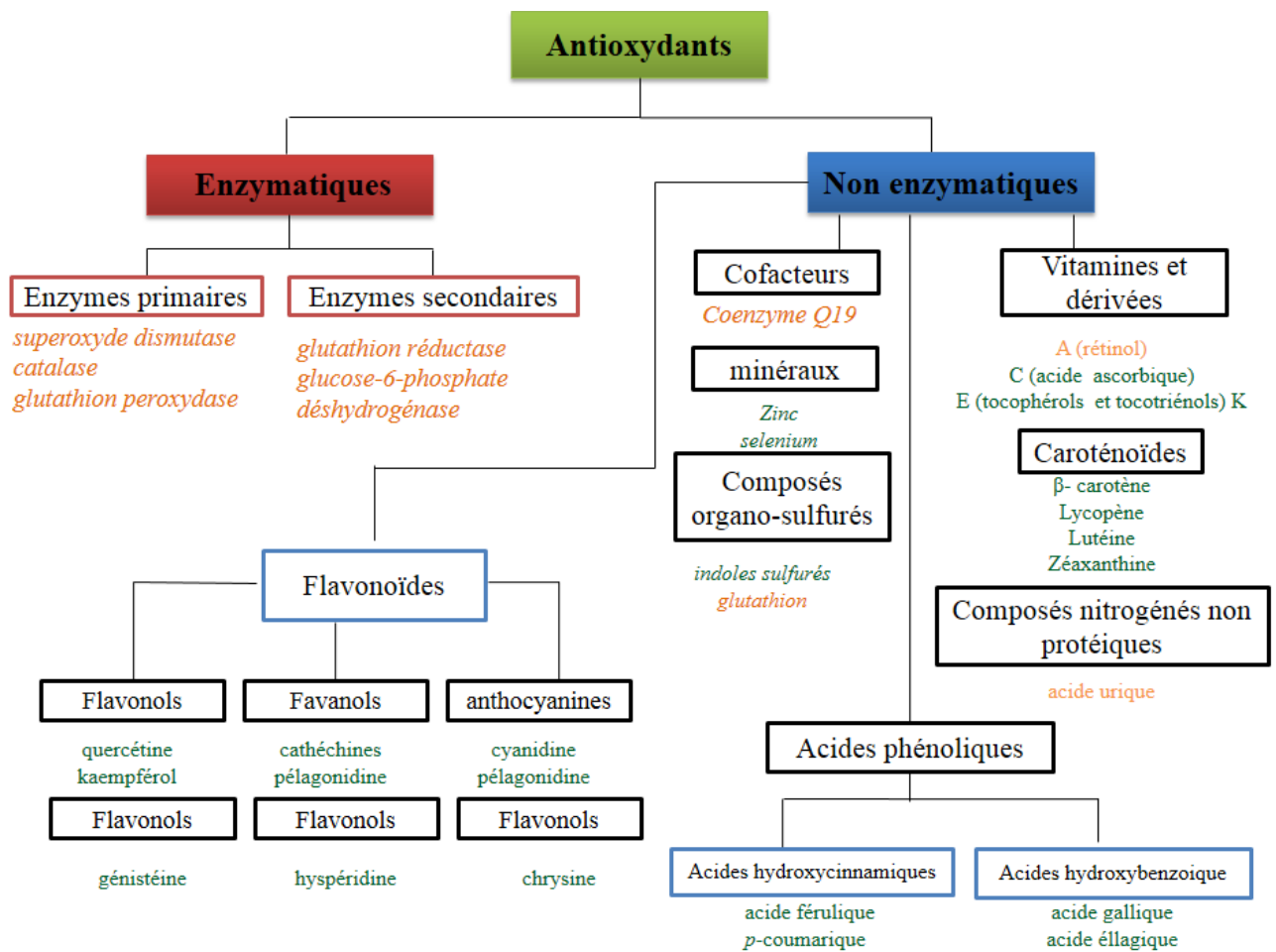
#### **4.1. Antioxydants endogènes**

Le réseau antioxydant est complexe et est constitué de molécules endogènes et exogènes. Certains antioxydants sont synthétisés par les cellules de l'organisme et d'autres sont fournis obligatoirement par l'alimentation. Parmi ces antioxydants endogènes (Figure 7), le groupe des enzymes superoxyde dismutases (SOD) qui éliminent le radical anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) en accélérant sa conversion en eau oxygénée. Deux SOD sont connues: la MnSOD (contenant du manganèse dans le site actif), retrouvée dans les mitochondries et la CuZnSOD (contenant du cuivre et du zinc dans le site actif) largement rencontrée dans le cytosol. Les catalases convertissent l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ). Les glutathion peroxydases (GSHPX) convertissent également l'eau oxygénée en eau et sont parmi les rares enzymes dans l'organisme à nécessiter du sélénium pour leur action. Elles éliminent l'eau oxygénée en oxydant le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). La glutathion réductase est une enzyme flavoprotéique, qui régénère le GSH à partir de GSSG en utilisant le NADPH comme source réductrice. En plus de ces enzymes, des radicaux libres piègeurs de faibles poids moléculaires existent (Halliwell, 1999).

Plusieurs métabolites secondaires sont des molécules à potentiel oxydo-réducteur actif capables de moduler l'équilibre redox intracellulaire dans les cellules du vivant. La plupart de ces métabolites se comportent comme des antioxydants, néanmoins d'autres se comportent comme des prooxydants (Jacob *et al.*, 2011).

Les composés phytochimiques antioxydants des plantes du règne végétal continuent à susciter l'intérêt de la communauté scientifique, dans plusieurs disciplines de la recherche du vivant,





**Figure 8:** différentes classes des antioxydants naturels endogènes (en couleur orange) et exogènes (en couleur verte) (Carocho et Ferreira, 2013).

mais aussi des responsables des industries agroalimentaires, dans plusieurs des formulations alimentaires qui nécessitent leur stabilisation vis-à-vis des phénomènes d'oxydation, des producteurs agricoles et consommateurs pour leurs rôles les plus diverses dans le maintien de la santé humaine. L'importance de ces molécules bioactives (Figure 8) est ressentie sur deux plans essentiels : la santé humaine et la conservation des aliments.

#### **4.2. Antioxydants exogènes**

Les prooxydants, assez souvent pris comme synonymes des espèces oxygénées réactives, sont des substances toxiques qui causent des dommages oxydatifs sur des constituants majeurs des systèmes biologiques. Ces dommages peuvent être contrecarrés à travers trois types de modifications du régime alimentaire :

1. Réduction des réactions qui génèrent les radicaux libres;
2. Réduction des composés alimentaires susceptibles d'augmenter les niveaux des réactions générant les radicaux libres (lipides polyinsaturés) ;
3. Supplémentation du régime alimentaire d'un ou de plusieurs inhibiteurs des radicaux libres (antioxydants) (Black, 2004).

Dans plusieurs domaines de recherches (les sciences alimentaires, la conservation du patrimoine, les polymères et l'industrie des huiles minérales) les scientifiques utilisent le terme « antioxydant » dans différents contextes en relation avec le problème posé dans leurs domaines d'expertise éventuellement. Un antioxydant est une quelconque substance qui, à faible concentration par rapport au substrat oxydable, ralentit ou prévient de manière significative l'oxydation d'un tel substrat (Halliwell, 2004). C'est une molécule bioactive qui est apte à piéger les espèces oxygénées réactives même à faible concentration (Haton, 2005). Il peut s'agir aussi de composés acides, qui peuvent être utilisés dans les aliments et permettent de donner un électron ou un atome d'hydrogène pour un radical peroxyde ou alkoxy. Ceci met fin à une réaction en chaîne de peroxydation lipidique ou permet de régénérer un composé phénolique, ou même chélater de manière efficace un métal de transition à caractère prooxydant (Porter, 1993 ; Aruoma, 1996).

Un composé peut exercer une action antioxydante *in vivo* ou dans un aliment par inhibition de la génération des ERO, ou par piégeage direct des radicaux libres. *In vivo*, l'action antioxydante peut se traduire aussi par l'augmentation des niveaux des défenses antioxydantes endogènes

(action sur l'expression des gènes codant pour la SOD, la catalase et la glutathion peroxydase) (Aruoma, 1999).

Toutefois, il est utile de préciser que le terme antioxydant pour une substance n'est valable que dans certaines situations: une substance qui ralentit l'oxydation des lipides dans certaines conditions, peut au contraire la promouvoir pour des conditions totalement différentes (McClements et Decker, 2000).

L'effet des antioxydants a été expliqué de par leur action selon deux mécanismes : le premier étant le piégeage des radicaux libres (effet scavenging) et la rupture de la réaction en chaîne. Le second mécanisme concerne la décomposition des hydroperoxydes (Endo *et al.*, 1985 ; Ribeiro *et al.*, 2001).

Les antioxydants peuvent être classés de différentes manières. Selon leur origine, on peut distinguer deux types : i) les antioxydants enzymatiques (enzymes antioxydantes faisant partie des antioxydants endogènes) synthétisés par l'organisme humain et ii) les antioxydants non enzymatiques ou nutriments antioxydants apportés par l'alimentation (Figures 7 et 8) (Pastre, 2005).

Toutefois, la classification la plus retenue est celle se basant sur leur mécanisme d'action en antioxydants primaires ou secondaires. Certaines substances bioactives possèdent plus d'un mécanisme d'action pour l'activité antioxydante (Akoh et Min, 2002).

Le classement des antioxydants selon leur mécanisme d'action fait intervenir plusieurs critères (Buettner, 1993 ; Rolland, 2004 ; Cillard et Cillard, 2006 ; Laguerre *et al.*, 2007)

- Les antioxydants primaires (dits aussi piégeurs de radicaux, radicalaires, vrais ou encore antioxydants briseurs de chaîne) assurent l'interruption de la chaîne catalytique en interceptant les radicaux libres propagateurs de la peroxydation lipidique et la retardent. Ils s'oxydent à la place du substrat d'oxydation (acides gras) mais n'évoluent pas au stade radicalaire. Une période d'induction est observée dans ce cas. Les molécules qui remplissent ce rôle sont surtout les tocophérols, les tocotriénols, les flavonoïdes, les acides phénoliques et les stilbènes et les antioxydants de synthèse (BHA, BHT et les gallates). Dans cette catégorie, on rencontre deux types d'antioxydants qui agissent par deux mécanismes : les donneurs d'hydrogène et les antioxydants sacrifiés ;
- Les antioxydants secondaires (dits également préventifs) permettent l'inhibition de la production des radicaux libres, empêchent la formation des espèces oxygénées réactives

ou interceptent celles responsables de l'initiation de l'oxydation lipidique. Dans cette catégorie on retrouve :

- les chélateurs des métaux de transition (transferrine, ferritine, lactalbumine, acides phosphorique, succinique, ascorbique, nitrilotriacétique, phytique, desferrioxamine, EDTA) ;
- les désactivateurs (quencheurs) de l'oxygène singulet (caroténoïdes, histidine) ;
- les éliminateurs des hydroperoxydes (enzymes antioxydantes, pyruvate) ;
- les piègeurs de l'oxygène (sulfites, acide ascorbique).

Les antioxydants peuvent contracter des liaisons entre eux quand ils sont en mélange. Cette constatation a pour conséquence l'observation de trois effets : *i*) un effet synergique se produit lorsqu'un antioxydant moins efficace dans la stabilisation des radicaux libres régénère un antioxydant plus efficace, *ii*) un effet antagoniste est observé dans le cas où l'antioxydant le plus efficace régénère l'antioxydant le moins efficace, *iii*) un effet nul lorsque les antioxydants ont la même efficacité vis-à-vis de la stabilisation des radicaux lipidiques où quand les antioxydants n'interagissent pas entre eux (Peyrat-Maillard *et al.*, 2003 ; Roman, 2013). Pour qu'un antioxydant soit efficace, certaines des propriétés chimiques importantes doivent être prises en considération dont le potentiel de réduction, l'énergie des liaisons hydrogènes, la délocalisation par résonance et la sensibilité de l'antioxydant à l'auto-oxydation lipidique. Le potentiel d'oxydo-réduction explique parfaitement la capacité d'un composé à céder un atome d'hydrogène. Quand la réaction est possible, ce composé doit avoir un potentiel de réduction plus faible que le composé oxydé (Min et Boff, 2002 ; Roman, 2012).

#### **4.2.1. Composés phénoliques**

Les plantes synthétisent divers métabolites secondaires, dont la portion la plus significative est représentée par les polyphénols (Crozier *et al.*, 2008). L'argument d'après lequel les polyphénols jouent des rôles cruciaux dans l'écologie et la physiologie de la plante, s'est étendu dans le domaine de la recherche biomédicale qui a démontré que la présence des polyphénols dans les aliments permet de lutter contre les maladies chroniques contemporaines, via leur activité antioxydante notamment (Daeeuf et Lattanzio, 2008). Ces dernières décennies, ils ont surtout attiré l'attention après la découverte de ce qui a été qualifié du « paradoxe français » pour lequel il a été observé que, malgré la tendance des français à fumer et un régime alimentaire riche en gras, ils enregistrent les taux les plus bas dans la contraction des maladies coronariennes comparativement aux autres pays européens (Royaume uni et Allemagne) (Renaud et De Lorgeril, 1992). L'explication de ce phénomène chez les français a été reliée à

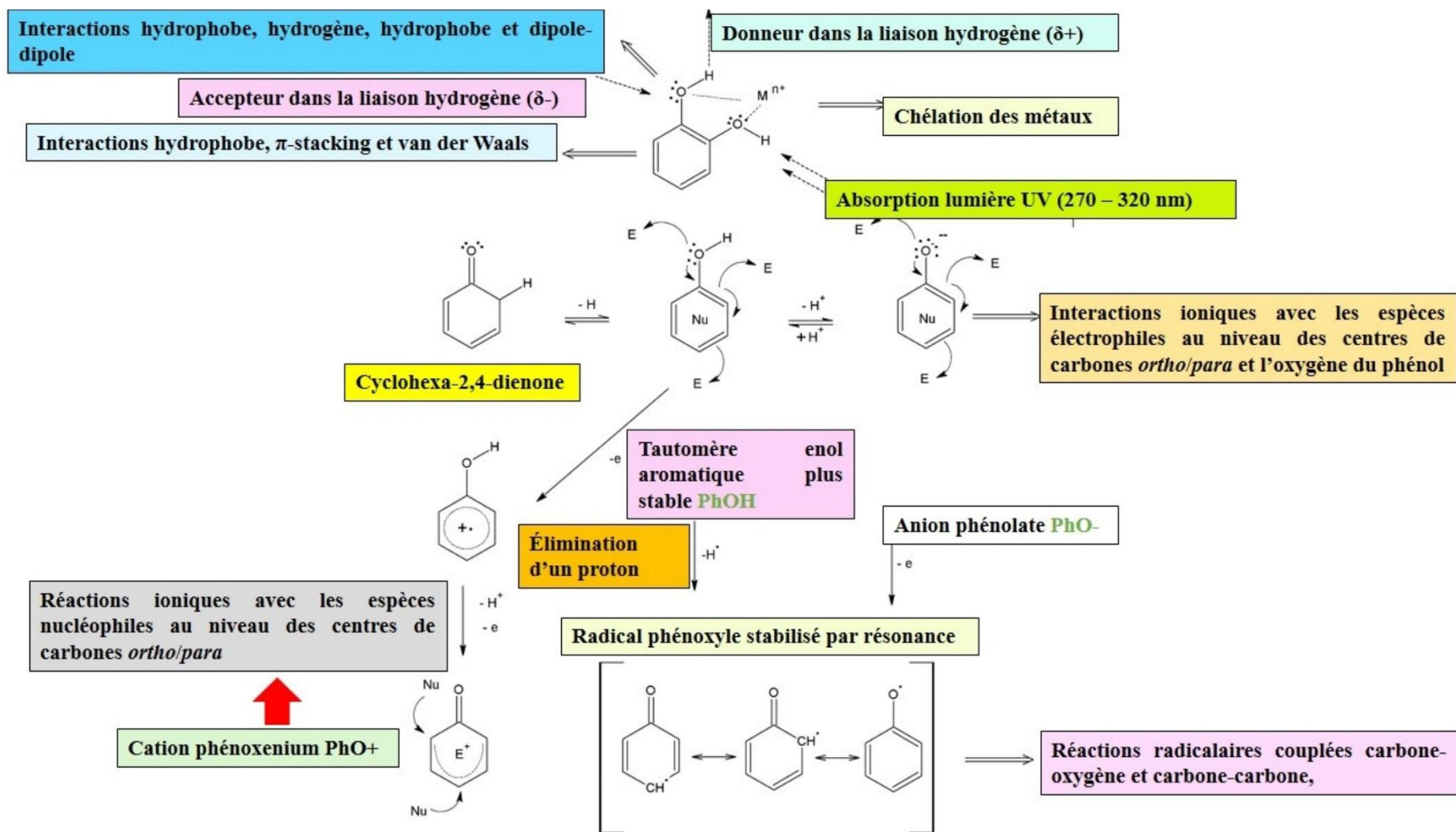
la consommation journalière élevée des vins rouges (riches en polyphénols), ce qui les protège d'une certaine manière des maladies cardiovasculaires (Frankel *et al.*, 1993 ; Hertog *et al.*, 1993).

Le terme « polyphénols » englobe huit milles composés naturels qui possèdent un caractère structural commun : la présence d'un phénol (un anneau aromatique qui contient au moins un groupement hydroxyle comme substitut). La classification des composés phénoliques en polyphénols et phénols simples repose sur le nombre de sous-unités phénols (Figure 8). Les phénols simples incluent les acides phénoliques. Les composés phénoliques qui possèdent au moins deux sous-unités phénoliques incluent les flavonoïdes et les stilbènes, et ceux possédant trois et plus de ces sous-unités sont dits tannins (hydrolysables et non hydrolysables) (Robbins, 2003). En plus du nombre de noyaux phénoliques, les éléments structuraux liés à ces noyaux interviennent aussi dans la classification des composés phénoliques (Robards *et al.*, 1999).

Les polyphénols des plantes trouvent leur origine biogénétique dans deux principales voies biosynthétiques : la voie du shikimate (Figure 6) et la voie polyketide ou acétate. La première aboutit à la formation des phénylpropanoïdes (acides hydroxycinnamiques et coumarines), tandis que la seconde produit des phénols simples mais aussi des quinones. Les flavonoïdes, le groupe dominant des polyphénols, sont issus de la biosynthèse combinée des deux voies (Dey et Harborne, 1989).

Ceci donne lieu à une diversité chimique structurale responsable d'une diversité des rôles pour les polyphénols. Certains assurent un rôle de soutien mécanique pour la plante, l'attraction des pollinisateurs, l'induction des réactions défensives jouant ainsi le rôle de signaux contre les stress biotiques et abiotiques. D'autres la protègent contre les radiations ultra-violettes agressives ou une perte excessive en eau, permettent la suppression de la croissance de plantes compétitives (allopathie) et fournissent une protection contre les herbivores et les pathogènes (De la Rosa *et al.*, 2009).

Les propriétés physicochimiques des polyphénols expliquent de manière très précise les mécanismes de l'activité antioxydante qu'ils démontrent. Ces propriétés caractéristiques



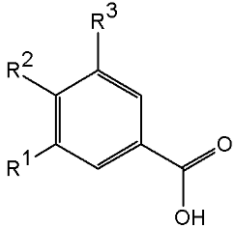
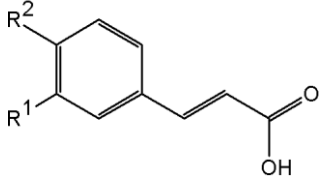
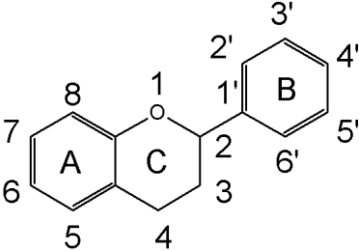
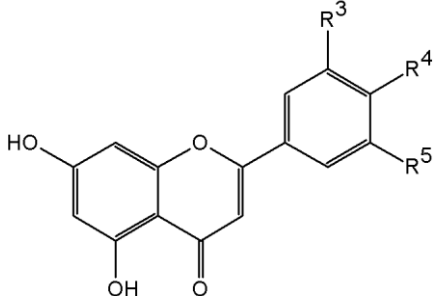
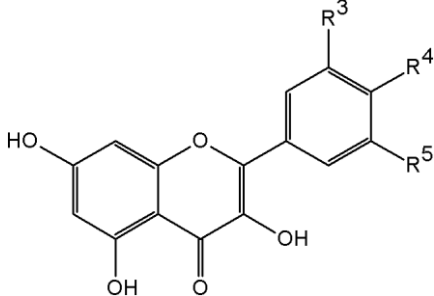
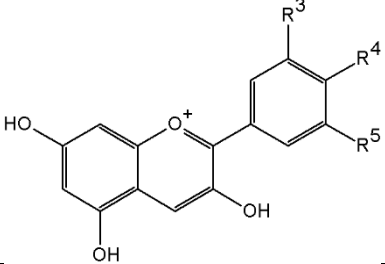
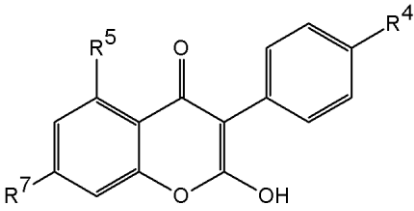
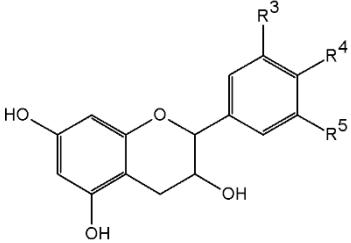
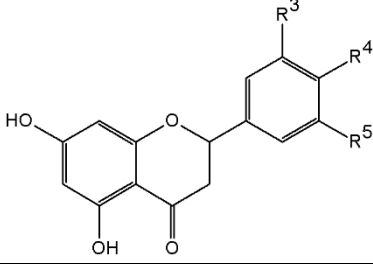
**Figure 9** : propriétés et réactivité du groupement phénolique. E : électrophile, Nu : nucléophile, PhOH : phénol (Quideau *et al.*, 2011).

concernent la nucléophilie, le caractère réducteur, la polarisabilité, le caractère donneur ou accepteur des atomes d'hydrogènes et l'acidité, et sont liées au phénomène de mésomérie qui prend place au niveau du noyau phénolique (Nkhili, 2009). La fonction phénolique paraît ainsi comme l'élément clé qui confère aux polyphénols les propriétés précédentes. Elle constitue le fragment amphiphile du polyphénol, dont la partie hydrophobe est représentée par le noyau aromatique planaire et la partie hydrophile par la fonction hydroxyle. Les interactions de van der Waals et la formation des liaisons hydrogènes (Figure 9), bien que dichotomiques, ont des effets complémentaires qui permettent aux composés phénoliques des plantes d'interagir physiquement avec des biomolécules comme les protéines (Quideau *et al.*, 2011).

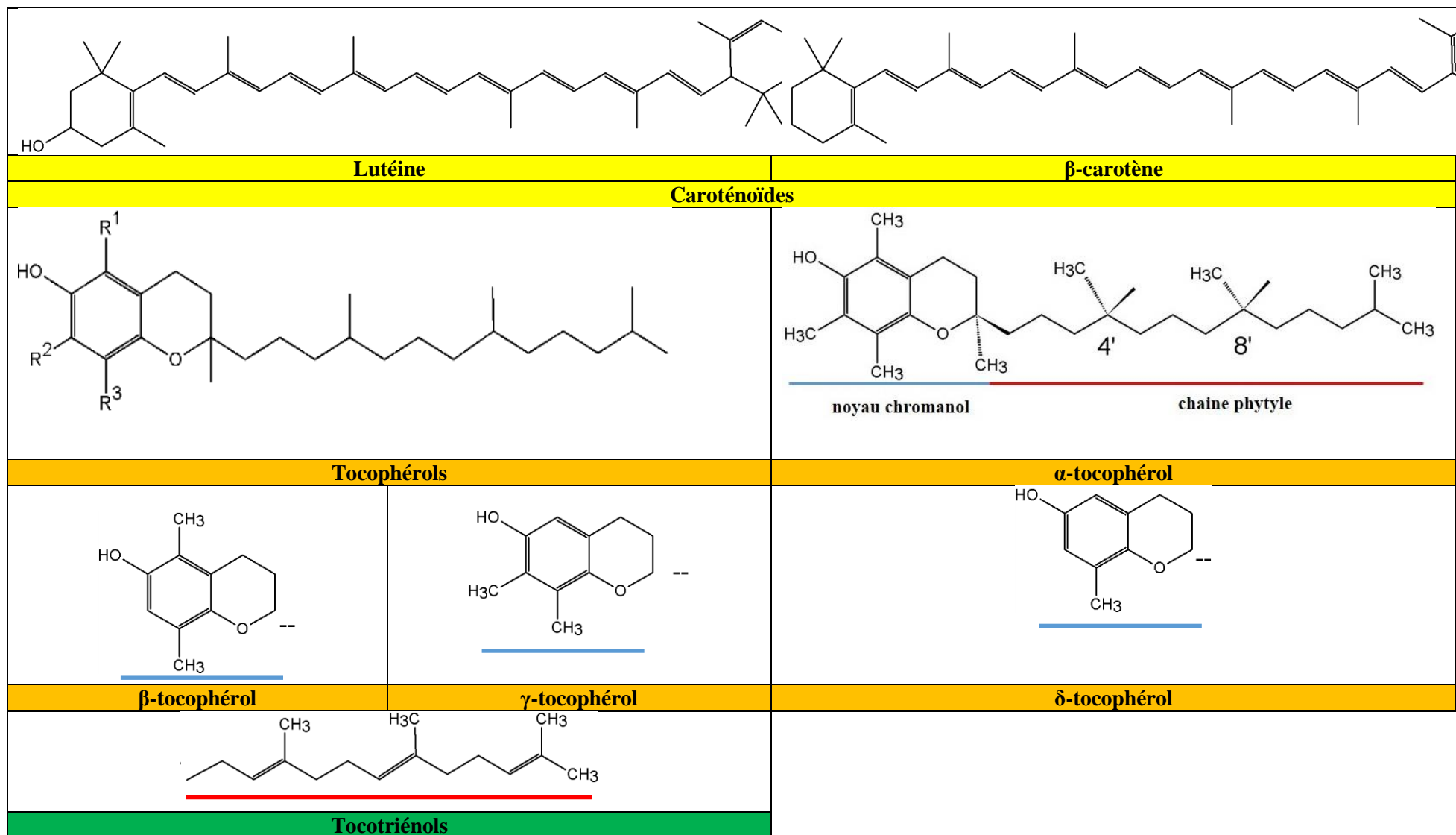
#### **4.2.1.1. Acides phénoliques**

Les acides phénoliques (Figures 8 et 10) est une sous-classe des composés phénoliques qui correspond à un groupe distinct d'acides organiques et est subdivisé en deux groupes : les acides hydroxycinnamiques et les acides hydroxybenzoïques. Bien que le squelette de base soit le même, le nombre et les positions des groupements hydroxyles engendrent la diversification des composés dans ce groupe. Dans plusieurs cas, les analogues aldéhydes rentrent dans cette sous-classe. Les acides hydroxycinnamiques sont généralement estérifiés, sauf dans les aliments qui ont subi une congélation, stérilisation ou fermentation où des formes libres sont observées. Ils sont plus répandus dans les aliments que les acides hydroxybenzoïques (Figure 10). Ces derniers peuvent se présenter sous des formes libres ou estérifiés dans la nature, se trouvent rarement dans les plantes à consommations humaine et sont généralement considérés d'un intérêt nutritionnel moindre (Robbins, 2003 ; Manach *et al.*, 2004).

L'activité antioxydante des acides phénoliques dépend surtout de la position et du nombre des groupements phénoliques. Les acides monohydroxybenzoïques ayant une fonction hydroxyle en position *ortho*- ou *para*- par rapport à la fonction carboxyle ne montrent aucune activité antioxydante, alors que les acides *m*-hydroxybenzoïques montrent un tout autre cas. L'activité antioxydante des acides phénoliques augmente avec l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles, l'addition d'une deuxième ou troisième fonction hydroxyle sur les cycles aromatiques des acides cinnamiques permet une augmentation de leur efficacité comme antioxydants. L'activité antiradicalaire des acides hydroxycinnamiques est supérieure à celle de leurs correspondants hydroxybenzoïques. Ceci est probablement expliqué par le fait que le groupement  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$  dans les acides hydroxycinnamiques permet de céder plus facilement un atome H et assure une meilleure stabilisation du radical par rapport à la fonction

	<p><math>R_1 = R_3 = H ; R_2 = OH</math> : acide p-hydroxybenzoïque  <math>R_1 = R_2 = R_3 = OH</math> : acide gallique  <math>R_1 = R_2 = OH ; R_3 = H</math> : acide protocatéchuique  <math>R_1 = H ; R_2 = OH ; R_3 = OCH_3</math> : acide vanillique  <math>R_1 = R_3 = OCH_3 ; R_2 = OH</math> : acide syringique</p>		
<p><b>Acides hydroxybenzoïques</b></p>			
	<p><math>R_1 = R_2 = H</math> : acide cinnamique  <math>R_1 = OH ; R_2 = H</math> : acide coumarique  <math>R_1 = R_2 = OH</math> : acide caféique  <math>R_1 = OCH_3 ; R_2 = OH</math> : acide férulique</p>		
<p><b>Acides hydroxycinnamiques</b></p>			
			
<p><b>Structure générale des flavonoïdes</b></p>			
			
<p><b>Anthocyanidines</b></p>	<p><b>Isoflavones</b></p>	<p><b>Flavanols</b></p>	<p><b>Flavanones</b></p>





**Figure 10** : structures chimiques et classes des antioxydants exogènes (Heim *et al.*, 2002 ; Schmidt *et al.*, 2004 ; Pastre, 2005 ; Léger, 2006 ; Laguerre *et al.*, 2007; Monserrat, 2011 ; Grigoras, 2012).

carboxylique –COOH des acides hydroxybenzoïques (Cuvelier *et al.*, 1992 ; Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Cos *et al.*, 1998 ; Goupy *et al.*, 2003 ; Dufour et Loonis, 2007 ; Roman, 2013).

#### **4.2.1.2. Flavonoïdes**

Plus de 8000 composés phénoliques, dont 4000 flavonoïdes ont été déjà identifiés et le nombre ne cesse d'augmenter. Ce sont des composés à bas poids moléculaire, contenant quinze atomes de carbones, arrangés selon la configuration C6-C3-C6 dite structure diphenylpropane (Figure 10). La structure est essentiellement constituée de deux anneaux aromatiques A et B, rattachés par une jonction à trois carbones, le plus souvent sous forme d'un hétérocycle oxygéné C. L'anneau aromatique A provient de la voie biosynthétique malonate/acétate, alors que l'anneau B dérive de la phénylalanine via la voie biosynthétique du shikimate (Figure 6) (Merken et Beecher, 2000 ; Muanda, 2010). Le terme flavonoïdes est utilisé pour décrire une large gamme de composés dérivés du noyau flavone (qui dérive lui-même du noyau flavane de base) ou noyau 2-phényl chromane à fonctionnalité phénylbenzopyrane. En fonction de la position de liaison du noyau aromatique dans la partie chromane (benzopyrane), ce groupe de composés peut être divisé en trois classes : *i*) les flavonoïdes (2-phénylbenzopyranes), *ii*) les isoflavonoïdes (3-benzopyranes) et *iii*) les néoflavonoïdes (4-benzopyranes). La première classe comprend les flavanes, flavanones, flavones, flavonols, dihydroflavonols, flavan-3-ol, flavan-4-ol et les flavan-3,4-diol. La seconde classe est composée des isoflavanes, isoflavones, isoflavanones, isoflav-3-ene, isoflavanol, roténoïdes, coumestanes, 3-arylcoumarines, coumaronochromènes, coumaronochromones et petrocarpanes. La dernière classe est composée des 4-arylcoumarines, 3,4-dihydro-4-arylcoumarines et les néoflavènes. Des flavonoïdes dits « mineurs » sont aussi rencontrés tels que les chalcones et les aurones (Frankel, 1999 ; Girotti-Chanu, 2006 ; Grotewold, 2006 ; Seyoum *et al.*, 2006 ; Kaiserova *et al.*, 2007).

Les phénols simples et les flavonoïdes sont des composés de faibles poids moléculaires et leur solubilité dépend de leurs polarités et de leurs structures chimiques (degré de glycosylation, hydroxylation et acylation). Certains peuvent se lier aux composés des parois cellulaires végétales (polysaccharides et lignines) (Bravo, 1998). Les flavonoïdes s'associent à différents types de sucres tels que glucose, rhamnose, galactose, arabinose et xylose. Le processus de leur biosynthèse nécessite de la lumière, ce qui engendre une répartition de ces molécules dans les parties extérieures des fruits et feuilles des plantes où ils se trouvent (Grigoris, 2012).

Le concept structure-activité permet d'expliquer le mécanisme par lequel les composés phénoliques expriment pleinement leur activité antioxydante. Les flavonoïdes tiennent leur

activité antioxydante des caractéristiques structurales et de la nature des substitutions sur les anneaux B et C. Les aspects suivants sont constatés quant à l'impact des facteurs cités sur l'activité antioxydante des flavonoïdes (van Acker *et al.*, 1996 ; Pietta, 2000 ; Seeram et Nair, 2002 ; Balasundram *et al.*, 2006 ; Grigoris, 2012) :

1. Le degré d'hydroxylation et les positions des groupements –OH au niveau de l'anneau B. La présence du groupement catéchol (structure *ortho*-dihydroxyle de l'anneau B) permet d'obtenir une activité antioxydante plus élevée, car il confère une plus grande stabilité au radical aroxyyl par délocalisation électronique et agit comme site préférentiel de la liaison des métaux ;
2. La présence des groupements hydroxyles sur les positions 3'-, 4'- et 5'- de l'anneau B (groupement pyrogallol) permet d'augmenter l'activité antioxydante des flavonoïdes par rapport à ceux qui ne possèdent qu'un groupement hydroxyle ;
3. La présence d'une double liaison entre les carbones C2- et C3-, conjugué avec le groupement 4-oxo dans l'anneau C permet d'augmenter la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres (capacité scavenging des radicaux libres) ;
4. La formation d'une double liaison entre C2- et C3-, combinée avec un groupement 3-OH dans l'anneau C, permet également l'augmentation de la capacité scavenging des flavonoïdes vis-à-vis des radicaux libres ;
5. La substitution des groupements hydroxyles dans l'anneau B par les groupements méthyles influe négativement sur le potentiel redox, ce qui affecte la capacité scavenging des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont des composés qui ont la capacité de piéger plusieurs espèces oxygénées réactives et radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle, radical peroxy et l'oxygène singulet). Plusieurs flavonoïdes sont considérés comme étant des chélateurs des ions métalliques de transition (fer et cuivre), permettant de diminuer significativement leur capacité à promouvoir la formation des espèces réactives (Girotti-Chanu, 2006 ; Halliwell, 2007). Ils ont des rôles éclectiques dont : piégeage des radicaux libres (propriété scavenging), prévention de l'oxydation des LDL, inhibition des enzymes hydrolytiques et oxydatives, manifestent des propriétés anti-inflammatoires, jouent un rôle dans la protection contre les rayonnements ultraviolets, dans la défense des plantes contre les microorganismes pathogènes, la fertilité des plantes et les interactions plantes-microorganismes (Frankel, 1999 ; Girotti-Chanu, 2006).

#### **4.2.1.3. Anthocyanines**

Contrairement aux feuilles jaunes et oranges en automne qui résultent de la décomposition de la chlorophylle et le démasquage des pigments caroténoïdes déjà présents, la plupart des feuilles rouges résultent de la synthèse *de novo* des anthocyanines (Feild *et al.*, 2001 ; Lee, 2002). Pour la plupart des plantes vasculaires, les anthocyanines sont les pigments flavonoïdes les plus significatifs qui confèrent la coloration rouge aux feuilles particulièrement la cyanidin-3-*O*-glucoside (existant sous forme de solution dans la vacuole de la cellule végétale), mais aussi d'autres pigments comme les bétalaines, certains caroténoïdes, la thiarubrine, certains terpénoïdes, les 3-désoxyanthocyanines, les aures, les chalcones et quelques flavonols ayant un rôle limité dans la couleur des fleurs (Gould, 2004 ; Gould *et al.*, 2008).

Les anthocyanines sont des pigments vacuolaires hydrosolubles qui peuvent se présenter sous différentes couleurs (rouge, orange, rose, pourpre ou bleue) en fonction du pH, et sont responsables des diverses colorations dans la plupart des fruits et légumes. Ils sont synthétisés via la voie biosynthétique des phénylpropanoïdes (Figure 6) et sont présents dans les différents tissus de la plante (fleurs, tiges, racines, feuilles et fruits) (Gould, 2004 ; Ignat *et al.*, 2011).

Les anthocyanidines (Figure 10) sont les structures de base des anthocyanines. Les anthocyanidines (aglycones phénoliques) consistent en un anneau aromatique A, lié en un anneau hétérocyclique C doté d'un atome d'oxygène qui, à son tour, est lié à un troisième anneau B via une liaison carbone-carbone. Les anthocyanidines glycosylées (liées à la partie sucre de la molécule) sont les anthocyanines proprement dites (Konczak et Zhang, 2004 ; Ignat *et al.*, 2011). Elles sont caractérisées par un squelette carboné de type flavane C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> et un nombre de dix-huit aglycones différentes ont été rapportées, dont les six principales sont les suivantes : pelargonidines, cyanidines, délphinidines, péonidines, pétunidines et malvidines. Les sucres communément liés aux anthocyanidines sont des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose), des di ou trisaccharides formés par combinaison des quatre monosaccharides précédents. Ces composés diffèrent dans les substitutions hydroxyles et méthoxyles au niveau de l'anneau B (Matile, 2000 ; Stintzing et Carle, 2004 ; Gould *et al.*, 2008 ; Ignat *et al.*, 2011).

Les anthocyanines, au même titre que les polyphénols, jouent le rôle d'antioxydants en donnant un proton pour un radical hautement réactif, permettant de prévenir la formation d'autres radicaux (Iversen, 1999 ; Ignat *et al.*, 2011). Leur potentiel antioxydant est fortement dépendant

du nombre, de l'arrangement des groupements hydroxyles, de la structure conjuguée et des substituants donneurs ou accepteurs d'électrons au niveau de la structure aromatique (Lapronik *et al.*, 2005 ; Ignat *et al.*, 2011).

#### **4.2.1.4. Tannins**

Les tannins sont des molécules à haut poids moléculaire qui représentent le troisième groupe le plus important des polyphénols. Ils sont subdivisés en deux classes : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (proanthocyanidines) (Dey et Harborne, 1989). Ce sont des oligomères et polymères des flavonols et possèdent une structure amphiphile (structure aromatique hydrophobe et groupements hydroxyles hydrophiles) (Ducasse, 2009 ; Cendre, 2010). Les proanthocyanidines (Figure 10) sont les oligomères et polymères des flavonols (Czochanska *et al.*, 1979). Les monomères de base qui les forment sont les flavon-3-ols. Les liaisons entre ces monomères sont assez labiles dans un milieu fortement acide, permettant de libérer des anthocyanidines (Cendre, 2010). En fonction de la nature de la liaison interflavanique mise en jeu, deux types de proanthocyanidines sont à distinguer : Les proanthocyanidines de types A et B. Les unités flavan-3-ols liées par des liaisons entre C4-C8 (la plus rencontrée) ou C4-C6 sont de type B. En plus de cette liaison, les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther entre les unités flavan-3-ols reliant les carbones C2-O-C7 ou C2-O-C5. Le type de liaison et le degré de polymérisation permettent de déterminer le type et le degré de bioactivité (Haslam, 1977 ; Gu *et al.*, 2002 ; Schmidt *et al.*, 2004).

Les tannins hydrolysables sont des dérivés de l'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque). L'acide gallique est estérifié à un noyau polyol. Les groupements galloyls sont ultérieurement estérifiés ou inter-liés de manière oxydative pour donner lieu à des tannins hydrolysables plus complexes. Les tannins sont de potentiels chélateurs des ions métalliques, des agents précipitants les protéines et des antioxydants dans les systèmes biologiques (Hagerman, 2002, Ignat *et al.*, 2011).

#### **4.2.1.5. Lignanes et stilbènes**

Les lignanes sont des molécules synthétisées par dimérisation oxydative de deux unités phénylpropanes et existent majoritairement sous forme libre (formes aglycones) dans la nature. Bien que peu étudiés, leur intérêt ne cesse de s'agrandir après avoir démontré leurs effets pharmacologiques bénéfiques et le potentiel pratique de leurs dérivés synthétiques en chimiothérapie. Le lin représente la principale source végétale de ces composés. La microflore

intestinale métabolise ces molécules en entérodiol et entérolactone (Saleem *et al.*, 2005 ; D'Archivio *et al.*, 2007 ; Ignat *et al.*, 2011, Temsamani, 2015).

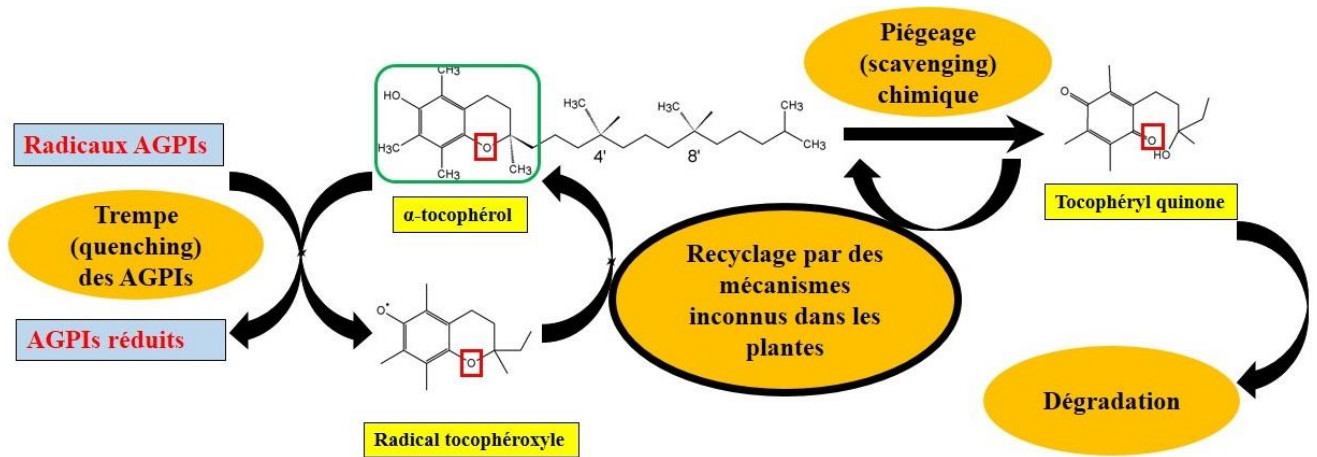
Les stilbènes, dont le squelette de base est le C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, sont issus de la voie biosynthétique des phénylpropanoïdes. L'unité de base des stilbènes étant le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène, existant sous les deux formes isomériques *cis* et *trans*) dont les substitutions par différents groupes (hydroxyles, méthoxyles et glucosides) permettent sa liaisons avec d'autres monomères de stilbènes pour aboutir à des oligomères complexes (Delmas, 2006 ; Temsamani, 2015). Ces composés phénoliques à faible poids moléculaire et à activité antifongique sont produits par les plantes en réponse aux agents pathogènes (Delmas *et al.*, 2006 ; Ignat *et al.*, 2011 ; Gatti, 2012 ; Temsamani, 2015).

### **4.3. Caroténoïdes**

Les caroténoïdes alimentaires sont des tetraterpénoïdes (C<sub>40</sub>) composés de huit unités isoprénoïdes, liés de sorte que la séquence est inversée au centre (Figure 10). Tous les caroténoïdes peuvent dériver du polyenelycopène acyclique (C<sub>40</sub> H<sub>56</sub>) conjugué par des réactions impliquant hydrogénation, déshydrogénation, cyclisation, réarrangement, isomérisation, insertion de fonctions oxygènes, migration des groupements méthyles et des doubles liaisons, élongation (extension) et raccourcissement de la chaîne hydrocarbonée. Ces processus peuvent être combinés pour donner naissance à une myriade de structures. La longue chaîne polyénique comprend en moyenne 11 doubles liaisons conjuguées. Une caractéristique qui distingue les caroténoïdes des autres métabolites secondaires est le système de doubles liaisons conjuguées. Cette chaîne polyénique est un chromophore absorbant la lumière et responsable des couleurs jaune, orange et rouge conférées aux aliments. Elle est également responsable de l'instabilité des caroténoïdes vis-à-vis de l'oxydation, de la lumière et de la chaleur (Goodwin, 1980 ; Rodriguez-Amaya, 2001 ; Chanforan, 2010).

Les deux groupes majeurs des caroténoïdes sont les carotènes et les oxycaroténoïdes (xanthophylles). Le premier est représenté par les caroténoïdes hydrocarbonés ( $\beta$ -carotène et lycopène), alors que le second comprend les dérivés hydroxy ( $\beta$ -cryptoxanthine), cétone (canthaxanthine), époxy (violaxanthine) et aldéhyde (citaurine) des carotènes. Ces groupements fonctionnels sont surtout responsables du degré de polarité, solubilité et comportement chimique des xanthophylles (Bauernfeind, 1981 ; Rodriguez-Amaya, 2015).

Les caroténoïdes sont considérés comme molécules qui sont aptes à promouvoir les fonctions vitales de l'organisme (provitamine A), fortification du système immunitaire et réduction des



**Figure 11** : quenching des AGPI et piégeage des ERO par l' $\alpha$ -tocophérol (DellaPenna et Bogson, 2006).

risques liés aux maladies dégénératives comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, la cataracte et la dégénérescence musculaire (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008 ; Strati et Oreopoulou, 2014).

En plus de leurs propriétés biologiques, les caroténoïdes sont employés comme antioxydants naturels pour la formulation d'aliments fonctionnels ou comme additifs dans les systèmes alimentaires pour la conservation et prolonger la date limite de consommation. Le lycopène et le  $\beta$ -carotène sont les deux pigments naturels autorisés pour être utilisés comme colorants alimentaires (Cadoni *et al.*, 1999 ; Strati et Oreopoulou, 2014).

Les caroténoïdes sont d'excellents piègeurs de l'oxygène et des espèces oxygénées réactives. Ils sont intégrés dans la stratégie de défense par piégeage de l'oxygène singulet et des radicaux peroxydes (Stahl et Sies, 2003 ; Stahl et Sies, 2005 ; Toor *et al.*, 2006).

#### **4.4. Tocophérols**

Le terme « vitamine E » est un nom générique qui désigne tous les dérivés tocols et tocotriénols qui montrent de manière qualitative une activité biologique similaire à l' $\alpha$ -tocophérol. Dans la structure des tocophérols et des tocotriénols (Figure 10), deux éléments sont à considérer : la tête chromane (ou hydroxychromane) constituée de deux anneaux (l'un est phénolique et l'autre étant un hétérocycle) et une chaîne phytyle (ou prényle). Cette caractéristique structurale confère à ces molécules un caractère amphipatique. Les quatre tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ ) dont la molécule de base est le tocol possèdent des chaînes saturées et ne diffèrent que par le nombre et la position des groupements méthyles, ainsi que dans les substitutions au niveau de l'anneau phénolique (noyau chromanol). Les tocotriénols ne diffèrent des tocophérols que par la présence de trois doubles liaisons au niveau de la chaîne latérale. De ce fait, les chaînes hydrocarbonées des tocophérols sont considérées linéaires alors que celles des tocotriénols adoptent une configuration *trans*. Les tocophérols se trouvent généralement sous forme de phénols libres dans la nature, alors que les tocotriénols se trouvent sous forme estérifiée. L' $\alpha$ -tocophérol est le plus répandue parmi les tocophérols et possède l'activité vitaminique la plus élevée. Les formes  $\alpha$  et  $\beta$  tocotriénols ont une activité vitaminique alors que les formes  $\gamma$  et  $\delta$  sont inactives (Kamel-Eldin et Appelqvist, 1996 ; Munné-Bosch et Alegre, 2002 ; Chanforan, 2010).



L' $\alpha$ -Tocophérol (possédant deux substituants méthyles en position *ortho*) est un puissant donneur de protons (Figure 11) par rapport aux  $\beta$  et  $\gamma$  tocophérols (un seul substituant méthyle en position *ortho*), à leur tour plus puissants que le  $\delta$ -tocophérol (n'ayant aucun substituant méthyle en position *ortho*). L'ordre de la puissance antioxydante pour les tocophérols peut être représentée comme :  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ , cependant leur concentration peut affecter ce classement (Kamel-Eldin et Appelqvist, 1996 ; Chotimarkron *et al.*, 2008; Dolde, 2009).

Les tocotriénols présentent des actions synergistes avec les tocophérols, polyphénols, stérols et autres composés contre la peroxydation lipidique (Qureshi *et al.*, 2001). Toutefois, Chow et Draper (1970) ont suggéré que les tocophérols et tocotriénols ont des effets similaires dans la protection contre l'oxydation des huiles, bien que Hakkarainen *et al.* (1984) aient montré que l' $\alpha$ -tocophérol est plus efficace que l' $\alpha$ -tocotriénol dans la protection contre l'oxydation des lipides.

Chaque molécule de tocophérol peut neutraliser deux radicaux peroxydes (Burton et Ingold, 1981). Le radical tocophéryl est très stable et réagit très rapidement avec le radical peroxy et lentement avec les AGPI (Figure 11) (Heleno *et al.*, 2010). En plus de leur capacité à intercepter les hydroperoxydes, les tocophérols stabilisent les hydroperoxydes formés et préviennent leur décomposition en composés secondaires d'oxydation (Kinen *et al.*, 2000).

#### **4.5. Phytostérols**

Les stérols des plantes ou phytostérols sont des composés bioactifs de tous les aliments d'origine végétale. Ce sont des composés alcools à 27-29 atomes de carbones et ressemblent beaucoup au cholestérol des vertébrés en termes de fonction (stabilisation des bicouches lipidiques des membranes des cellules végétales) et structure (noyau stéroïde, groupement 3  $\beta$ -hydroxyle, double liaison au niveau des carbones 5 et 6). Les phytostérols peuvent contenir un groupement méthyle ou éthyle en plus ou une double liaison en plus. La plupart des phytostérols contiennent dans leurs chaînes latérales 9-10 atomes de carbone, au lieu des 8 atomes de carbone de la chaîne latérale du cholestérol. Les phytostérols appartiennent à la classe des 4-déméthylstérols de la série choléstanane, qui ont tous une double liaison au niveau du carbone C5 de l'anneau (Kochhar, 1983 ; Moreau *et al.*, 2002 ; Kritchevsky et Chen, 2005 ; Lagarda *et al.*, 2006).

Dans les plantes, plus de 200 types différents de phytostérols ont été rapportés, les plus abondants étant le  $\beta$ -sitostérol (24- $\alpha$ -éthylcholestérol), campestérol (24- $\alpha$ -méthylcholestérol) et le stigmastérol ( $\Delta^{22}$ , 24- $\alpha$ -éthylcholestérol) (Kritchevsky et Chen, 2005 ; Lagarda *et al.*, 2006).

Les effets physiologiques des phytostérols, principalement leurs propriétés hypocholestérolémiantes, ont suscité un intérêt inexorable quant à leur présence dans les aliments (Lagarda *et al.*, 2006). Ces effets se traduisent surtout par l'inhibition de l'absorption du cholestérol par les phytostérols, vu la similitude de ces derniers dans les propriétés physico-chimiques avec le cholestérol (Giral et Moulin, 2008), due à la diminution de la solubilisation du cholestérol libre dans les micelles (au niveau de l'intestin) et l'augmentation de sa sécrétion fécale. Ils sont également responsables de la modification du métabolisme du cholestérol, en permettant une meilleure clairance du LDL-c plasmatique (assurant l'estérification du cholestérol pour être transporté par les chylomicrons). D'autres effets des phytostérols sont également constatés (Séjourné, 2009).

En plus des propriétés hypocholestérolémiantes, les phytostérols montrent des effets antioxydants. L'avenastérol agit comme antioxydant dans les huiles à des températures élevées (températures de fritures) grâce à la présence du groupement éthylidène au niveau de la chaîne latérale de la molécule. Son activité antioxydante a été attribuée à la formation d'un radical libre allylique, puis son isomérisation pour donner des formes radicalaires plus stables (Gordon et Magos, 1983). Ils montrent également une activité antioxydante (radical-scavenging) en solution et participent à la protection et la stabilisation physique des membranes (Yoshida et Niki, 2003). Ils sont impliqués, avec leurs esters, dans la protection contre l'oxydation des lipides pour des températures élevées (Xu et Godber, 2001 ; Wang *et al.*, 2002).

#### **4.6. Huiles essentielles**

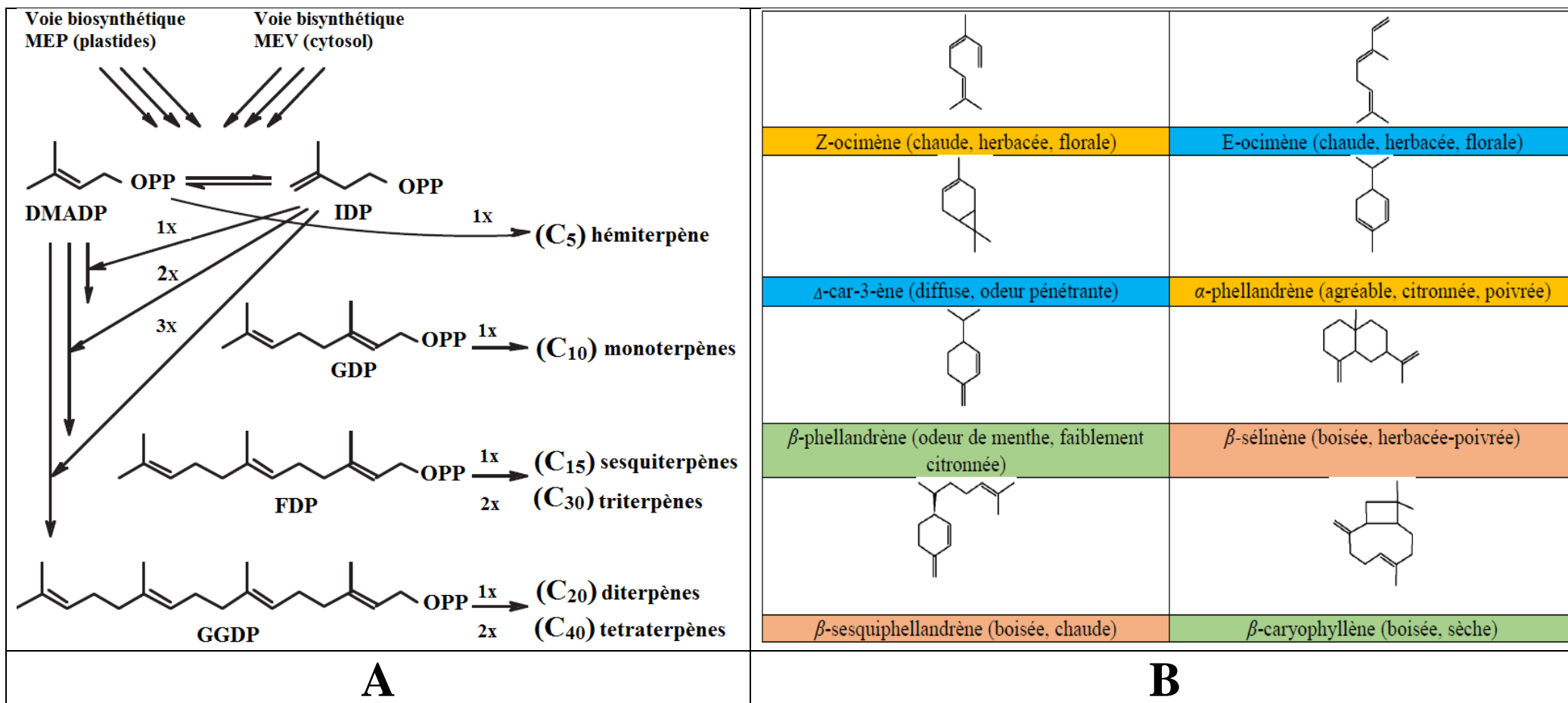
Les huiles essentielles sont des produits ou mélange de produits formés dans le cytoplasme, présents naturellement sous forme de petites gouttelettes entre les cellules. Elles sont volatiles, aromatiques et sont composées d'un mélange de substances odorantes (parfumées). Leur volatilité les différencie des huiles végétales, animales et minérales. Ce sont des substances généralement non colorées ou de couleur légèrement jaunâtre quand elles sont fraîchement distillées. Elles sont très peu solubles dans l'eau, plus ou moins solubles dans les alcools tels que l'éthanol, se mélangent aisément avec les graisses et huiles végétales mais aussi les cires. Selon leur usage, elles sont classées en : *i*) huiles essentielles pour parfumeries, savonneries et cosmétiques, *ii*) huiles essentielles pour aromatisation des aliments et des boissons et *iii*) huiles essentielles à intérêts thérapeutiques (Sonwa, 2000).

D'après la British Pharmacopeia (2009), l'huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière végétale brute, issue d'une plante

botaniquement définie, extraite par distillation à la vapeur, distillation sèche ou tout autre procédé mécanique adéquat sans chauffage. Les huiles essentielles sont assez souvent séparées de la phase aqueuse par un procédé physique, qui n'affecte pas de manière significative sa composition.

Les huiles essentielles produites comme métabolites secondaires sont stockées dans des cellules non différenciées (Lauraceae), secrétées par les organes sécréteurs tels que les poils glandulaires (Lamiaceae et Asteraceae), les canaux sécrétoires (Myrtaceae et Rutaceae) et les cavités sécrétoires (conifères). Parfois, les huiles essentielles ne sont pas formées dans la plante elle-même mais sont produites suite à une hydrolyse de certains composés présents dans la plante (cas de l'ail) (Evans, 2009 ; Baser et Buchbauer, 2010 ; Preedy, 2015). La sécrétion des huiles essentielles dans ces structures cellulaires spécialisées peut s'effectuer selon deux modes : sécrétion exogène à l'extérieur de la plante et sécrétion endogène dans les espaces intracellulaires spécialisés de la plante (Svoboda et Svoboda, 2000).

Les huiles essentielles trouvent leurs applications dans les domaines les plus divers des industries agroalimentaires, pharmaceutiques, parfumeries, cosmétiques, chimie fine, thérapie et aromathérapie. Les huiles essentielles issues des épices, des plantes aromatiques et médicinales sont utilisées comme ingrédients alimentaires remplissant deux rôles : aromatisants et conservateurs. La majorité d'entre elles sont considérées comme GRAS (Generally Recognized As Safe) (Baser et Buchbauer, 2010 ; Patra, 2012). Leurs activités biologiques sont strictement tributaires de leurs compositions biochimiques (Lis-Balchin *et al.*, 1998) et leur spectre d'activités biologiques et pharmacologiques est exceptionnellement large, justifiant par voie de conséquence leurs utilisations (Patra, 2012) dans les domaines de la nutrition et de l'agriculture pour leurs propriétés antibactérienne, antifongique, antivirale, nématocide, insecticide et antioxydantes (Turek et Stintzing, 2013 ; Lopez-Reyes *et al.*, 2013 ; Preedy, 2015). Leur utilisation comme antioxydants et bioconservateurs a été suggérée (Tiwari *et al.*, 2009 ; Hyldgaard *et al.*, 2012) par incorporation dans les emballages alimentaires actifs (Kuorwel *et al.*, 2011) et conservation des céréales et des denrées alimentaires apparentées (Adorjan et Bushbauer, 2010). Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles (Dandlen *et al.*, 2010) et antibactériennes (Lang et Bushbauer, 2012) n'est pas une garantie automatique pour leur application directe comme additifs alimentaires, car ceci exige l'acquisition du savoir nécessaire quant à leurs caractéristiques de sensibilité vis-à-vis des microorganismes cibles, spécificité du mode d'action, potentiel antimicrobien et effet des composés de la matrice alimentaire (Hyldgaard *et al.*, 2012 ; Preedy, 2016).



**Figure 12** : biosynthèse et propriétés de quelques terpénoïdes connus. (A) : schéma général de la biosynthèse des terpénoïdes par les plantes ; DMADP : diméthylallyl diphosphate, FD : farnésyl diphosphate, GDP : géranyl diphosphate, GGDP : géranyl géranyl diphosphate, IDP : isopentényl diphosphate, MEP : méthylérythritol phosphate, MEV : mévalonate. (B) : structures et odeurs des principaux hydrocarbures mono- (C<sub>10</sub>) et sesquiterpéniques (C<sub>15</sub>) (Brat, 2001 ; Bohlmann et Keeling, 2008).

Le terme « essentielle » dérive du terme « essence » pour désigner l'odeur ou la saveur, reliés à la propriété de ces substances à conférer des odeurs et des saveurs spécifiques aux plantes dont elles sont extraites. Par conséquent, les composés de l'huile essentielle doivent être suffisamment volatils pour qu'ils soient entraînés par la vapeur d'eau. Leurs points d'ébullition doivent être assez bas pour permettre la distillation. Il est donc nécessaire que leurs poids moléculaires soient inférieurs à 300 ou 400 Daltons. La présence de ces molécules aromatiques à l'état partiel de vapeur dans l'atmosphère s'explique par leur tension de vapeur élevée à température ambiante (Brat, 2001 ; Calsamiglia ; 2007 ; Baser et Bushbauer, 2010). Elles sont caractérisées par leurs diverses compositions, natures et activités. Deux groupes sont à distinguer : les terpénoïdes (monoterpénoïdes et sesquiterpénoïdes) et les phénylpropanoïdes. Ces deux groupes proviennent de précurseurs différents du métabolisme primaire et suivent des voies métaboliques de biosynthèse également différentes (Calsamiglia *et al.*, 2007).

De par leurs structures, les huiles essentielles peuvent être classées comme des alcools, des esters ou des aldéhydes dérivants des phénylpropanoïdes et des terpénoïdes (Greathead, 2003), le groupe des monoterpènes représente le groupe le plus abondant dans les huiles essentielles (Dudareva *et al.*, 2004). Les phénylpropanoïdes dérivent de la phénylalanine via la voie de biosynthèse du shikimate (Figure 6), alors que les terpénoïdes dérivent de l'acétyl-CoA via les voies de biosynthèse soit du désoxyxylulose ou celui du mévalonate (Figure 12A) (Hart *et al.*, 2008).

#### **4.6.1. Terpènes (terpénoïdes)**

La terminologie « terpènes » a été longtemps utilisée par les auteurs pour désigner ces molécules issues du métabolisme secondaires. De nos jours, ce terme est plutôt restreint aux monoterpènes hydrocarbonés. Les terpénoïdes constituent le groupe le plus important des substances naturelles issues des plantes, non seulement en termes de nombre de composés recensés (plus de 30000 composés), mais aussi en termes de diversité chimique, structurale et fonctionnelle (Figure 12B). Compte tenu des différentes manières par lesquelles l'unité isoprène de base peut-être assemblée, ainsi que la sélection naturelle exercée sur les organismes vivants lors de leur évolution, il n'est guère étonnant de percevoir une diversification des composés terpéniques dans la nature. Cette diversité est due à « la règle de l'isoprène », selon laquelle les terpènes sont formés par des arrangements linéaires des unités isoprènes (2-méthyle-butadiène) suivis de diverses cyclisations et réarrangements du squelette carboné. Ils peuvent ainsi subir une série de pertes ou d'addition d'atomes de carbones. L'assemblage des unités isoprènes se fait toujours dans une seule direction dite « tête-à-queue » ou « head-to-

tail ». La terminaison de la chaîne assurant la liaison (le branchement) est identifiée comme étant la tête et l'autre côté de la chaîne est considéré comme étant sa queue. En relation avec leurs unités isoprènes (isoprénoïdes ou isopréniques C<sub>5n</sub>) les terpènes peuvent être subdivisés en monoterpènes (C<sub>10</sub>), sesquiterpènes (C<sub>15</sub>), diterpènes (C<sub>20</sub>), sesterpènes (C<sub>25</sub>), triterpènes (C<sub>30</sub>) et tétraterpènes (C<sub>40</sub>) (Figure 12A), où le squelette carboné est acyclique ou peut contenir des structures mono-, bi-, tri-, tétra- et penta- cycliques (Connolly et Hill, 1991 ; Dzubak *et al.*, 2006 ; Gershenzon et Dudavera, 2007 ; Degenhardt *et al.*, 2009 ; Reddy et Couvreur, 2009 ; Baser et Bushbauer, 2010, Muffler *et al.*, 2011).

La classification d'un terpène se base sur une notation de type « a : b » où (a) représente le nombre des unités isoprènes et (b) le nombre d'atomes de carbone. Par exemple, les monoterpènes sont ainsi notés (2 : 10), sesquiterpènes (3 : 15), diterpènes (4 : 20), sesterpènes (5 : 25) ; triterpènes (6 : 30) et caroténoïdes (8 : 40). Les terpènes peuvent être plus ou moins lipophiles ou hydrophiles, volatils ou non volatils, cycliques ou acycliques (Reddy et Couvreur, 2009 ; Grigoras, 2012).

Les monoterpènes peuvent être classés à leur tour en monoterpènes acycliques ( $\alpha$ -myrcène, géraniol, citronellol, linalool), monocycliques (D-limonène, p-cymène, pulegone) et bicycliques (camphor,  $\alpha$ -pinène et sabinène). Les sesquiterpènes sont également classés en acycliques (farnésol et nérolidol) et cycliques (zingiberène, caryophyllène, gossypol) (Bohlmann et Keeling, 2008 ; Reddy et Couvreur, 2009).

#### **4.6.2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont généralement liquides à température ambiante. Leur solubilité dans l'eau est si faible comparée à leur solubilité dans les lipides, les alcools, les solvants organiques et les autres solutions à caractère hydrophobe (Thormar, 2010 ; Hashemi *et al.*, 2017). Le caractère biochimique complexe des huiles essentielles, leur faible rendement d'extraction et le besoin croissant pour ces substances jugées délicates et précieuses à obtenir a orienté les phytochimistes vers l'adoption de plusieurs techniques de plus en plus performantes (Lucchesi, 2005). Trois principales méthodes d'extraction qualifiées pour le moins de « traditionnelles » sont d'usage : l'expression à froid appliquée sur les agrumes (des fois réservées exclusivement pour la production des huiles essentielles du genre *Citrus*), la distillation sèche (utilisées rarement pour des cas particuliers) et l'hydrodistillation. Cette dernière constitue la méthode d'extraction la plus utilisée pour l'extraction des huiles

essentielles notamment à l'échelle industrielle (Burt, 2004 ; Lahlou, 2004 ; Baser et Bushbauer, 2016). Elles peuvent tout aussi

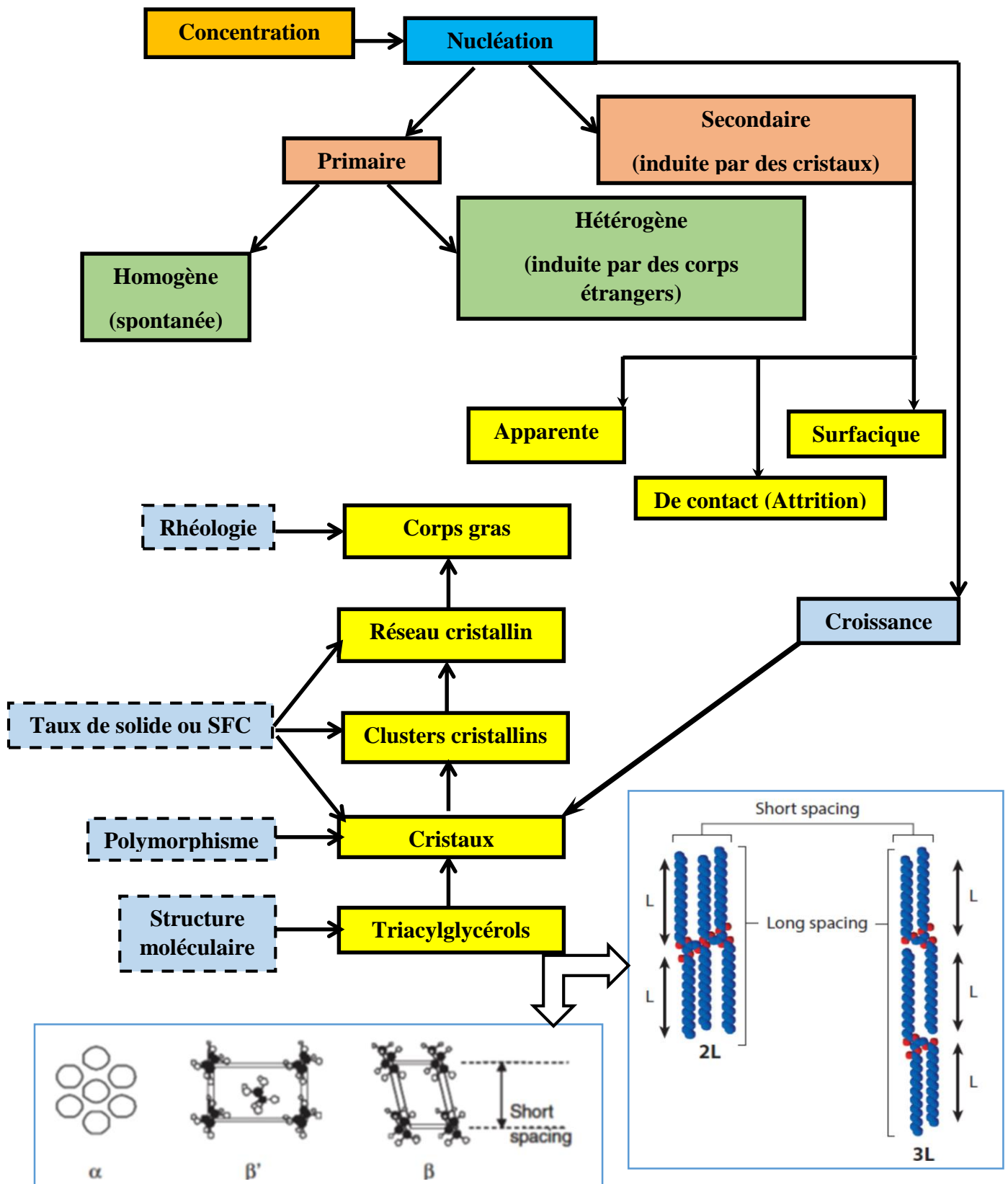
être extraites par entraînement à la vapeur d'eau, dont le rendement d'extraction est intimement lié à la plante étudiée et à la saison de sa récolte (Gonny *et al.*, 2004). En plus des techniques conventionnelles d'extraction des huiles essentielles (distillation-évaporation, extraction par les solvants, extraction à froid et hydrodiffusion), des techniques non conventionnelles ou innovantes ont été mises en place dans les laboratoires et à l'échelle industrielle et sont surtout représentées par : l'extraction à l'aide de solvants (ou fluides) supercritiques, l'extraction par la Flash-Détente (ou Détente-Eclair), la détente instantanée contrôlée, l'extraction par ultrasons et l'extraction assistée par micro-ondes (Bousbia, 2011). Les techniques d'extraction innovantes, telles que l'extraction par fluides supercritiques (extraction à l'aide du dioxyde de carbone par exemple, à basse température et à haute pression) (Santoyo *et al.*, 2005 ; Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007), l'extraction assistée par ultrasons (Vinatoru, 2001) et l'extraction assistée par micro-ondes (Kimbaris *et al.*, 2006 ; Cardoso-Ugarte *et al.*, 2013), ont été développées pour deux principales raisons: augmenter les rendements d'extraction (augmenter la production en huiles essentielles) et appliquer le concept de l'extraction « verte » ou écologique pour l'obtention de produits naturels (Guinoiseau, 2010 ; Hashemi *et al.*, 2018).

## **5. Cristallisation des lipides**

### **5.1. Phénomène de cristallisation et polymorphisme**

Les graisses et les huiles alimentaires sont des ingrédients importants dans les produits alimentaires. Ils sont particulièrement uniques dans le sens où ils développent des structures plastiques dans un large éventail de produits. Leur état physique est impliqué dans la perception des produits et confère les caractéristiques de texture (aspects crémeux, onctueux, lisse et sableux). Les propriétés organoleptiques des produits alimentaires (la sensation dans la bouche) sont déterminées par la structure, le profil de fusion et la capacité calorifique (Kropinski *et al.*, 1982, Smith *et al.*, 2011).

Le contrôle des propriétés physiques des lipides alimentaires passe par quatre aspects primordiaux à prendre en considération : *i*) compréhension des mécanismes qui régissent les structures moléculaires et cristallines, *ii*) mécanismes de cristallisation et de transformation des cristaux de lipides sous l'influence de facteurs externes, *iii*) compréhension des mécanismes de formation des réseaux cristallins de lipides aux niveaux macroscopiques et microscopiques et



**Figure 13** : schéma de la cristallisation, des niveaux de structuration moléculaire et des formes polymorphiques des lipides (de Graef, 2009 ; Sato et Ueno, 2011 ; Acevedo et Marangoni, 2015).



iv) propriétés rhéologiques et de texture conférées par les réseaux cristallins des lipides (Sato et Ueno, 2011).

Ces aspects peuvent être révélés par le polymorphisme d'une part et par les interactions moléculaires d'autre part. Le comportement cristallin des triglycérides est influencé par le polymorphisme, lié à la structure moléculaire (Sato, 2001). Le polymorphisme est défini comme étant la capacité d'un composé ou une substance à exister sous forme solide, avec un même enchaînement atomique de base, pouvant former différentes structures cristallines ayant les mêmes propriétés physico-chimiques que ce soit à l'état liquide ou à l'état de vapeur (Garti et Sato, 2001 ; Bauer, 2005). Le polymorphisme existe pour deux raisons : *i*) l'organisation spatiale des chaînes aliphatiques des acides gras présents dans les triglycérides et *ii*) l'empilement de ces derniers dans des structures appelées strates (Timms, 1984 ; Cansell, 2005).

La cristallisation des lipides est un phénomène qualifié d'unique par rapport à la cristallisation des autres composés alimentaires (eau, sucres et sels). Ce caractère unique vient du fait que les corps gras naturels ont une composition moléculaire assez complexe. En outre, l'orientation des molécules de triglycérides a une incidence physico-chimique importante impliquée dans la détermination du polymorphisme (Shahidi, 2005).

La cristallisation comprend deux grands événements : la nucléation et la croissance des cristaux (Figure 13). La nucléation est le développement de petites particules solides excédant un seuil de taille particulière dit taille critique. Un nucléus est le plus petit cristal pouvant exister dans une solution à une température donnée. La formation de celui-ci nécessite l'organisation des molécules dans une variété cristalline. Afin que la nucléation se produise, une barrière d'énergie libre doit être dépassée. Lorsque cette nucléation se produit, une libération d'énergie est constatée (chaleur latente de fusion) et les molécules de TAG adoptent le plus bas état énergétique à l'intérieur de la variété cristalline. Une fois le maximum d'énergie libre est atteint, il se forme un nucléus stable avec une taille critique au-delà de laquelle des nucléi stables continuent à croître. Il existe deux types de nucléations : primaire (homogène ou hétérogène) et secondaire. La croissance des cristaux se produit ainsi par incorporation d'autres molécules de TAG à partir de la phase liquide. La configuration appropriée pour cette molécule est importante pour sa fixation sur les sites au niveau de la surface cristalline. La croissance persiste tant qu'une force motrice pour la cristallisation existe. Elle prend fin quand le système atteint un équilibre de phase ou quand le système est entièrement cristallisé (Garti et Sato, 2001 ; Shahidi, 2005 ; Smith *et al.*, 2011).

Dans les systèmes alimentaires, deux types de cristallisations sont rencontrées : cristallisation à partir de la fusion et une cristallisation à partir de la supersaturation en solution (Hartel, 2013). La cristallisation se produit quand un système atteint une force motrice thermodynamique et une énergie d'activation conséquente nécessaire pour provoquer une transition de phase, généralement se produisant d'un liquide à un solide, avec libération d'une énergie sous forme de chaleur (chaleur de cristallisation). La cristallisation à partir d'une solution supersaturée repose sur les caractéristiques de solubilité dans le solvant pour atteindre un état métastable, permettant de fournir la force motrice thermodynamique nécessaire pour la nucléation et la croissance cristalline. D'autre part, la cristallisation à partir de la fusion est induite en refroidissant le système en dessous de son point de fusion, afin de générer la force motrice nécessaire pour la formation des cristaux. Les corps gras naturels étant un mélange de TAG à hauts et à bas points de fusion, les deux types de cristallisation ont généralement lieu (Zhou et Hartel, 2006 ; Patel et Dewettinck, 2015). Ainsi, le comportement cristallin des corps gras peut être représenté à travers trois phénomènes principaux : *i*) la nucléation qui représente la formation de la phase cristalline à partir de la phase liquide, à travers l'organisation des TAG à l'intérieur d'une maille cristalline, *ii*) la croissance des cristaux induite par l'inclusion d'autres TAG présents dans le milieu liquide dans la maille cristalline déjà présente et *iii*) le polymorphisme qui gouverne surtout l'ordre dans lequel les TAG sont empaquetés à l'intérieur des cristaux (Patel et Dewettinck, 2015).

Les formes polymorphiques dans les corps gras sont définies en fonction de la structure de la maille fondamentale qui constitue le réseau cristallin final. A l'instar des molécules composées de longues chaînes hydrocarbonées, les triglycérides peuvent se retrouver sous différentes formes cristallines. Ceci engendre l'apparition de plusieurs points de fusion pour un même TAG. Dans des TAG mixtes contenant des acides gras saturés et insaturés, le polymorphisme est particulièrement riche et pour la même température ceux-ci peuvent exister dans plusieurs polymorphes (jusqu'à 6 ou 7 formes différentes) (Cansell, 2005 ; Himawan *et al.*, 2006 ; Thivilliers, 2007). L'arrangement des éléments répétés entre les groupements méthyles des acides gras permet de définir la notion de sous-cellule cristalline et donc de variétés cristallines. Le plus souvent dans les corps gras trois formes polymorphiques typiques ou variétés cristallines ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\beta'$ ) sont rencontrées (Figure 13). Elles sont au nombre de trois : le polymorphe  $\alpha$  (maille de type hexagonale), le polymorphe  $\beta'$  (possédant une maille de type orthorhombique perpendiculaire) et le polymorphe  $\beta$  (maille de type triclinique parallèle). En fonction de la compacité et la densité des variétés polymorphiques, liées au degré des

interactions spécifiques entre chaînes hydrocarbonées, on peut distinguer deux types : les variétés stables qui forment un réseau dense et compact ( $\beta'$  et  $\beta$ ) et les variétés instables dont le réseau est lâche ( $\alpha$ ) et la perte des interactions interchaînes est responsable d'un tel comportement. La stabilité thermodynamique de ces variétés cristallines dépend surtout de la composition en AG des corps gras en question. Certains TAG mixtes contenant des AGI ne forment que la variété cristalline  $\beta'$  (Timms, 1984 ; Kodali *et al.*, 1987 ; Ueno *et al.*, 1999 ; Cansell, 2005). Le passage de variétés cristallines moins stables du point de vue thermodynamique ( $\alpha$  et  $\beta'$ ) vers des variétés cristallines plus stables ( $\beta$ ), d'un état liquide à l'état solide, de manière irréversible et en fonction de la température et du temps, définit le concept du polymorphisme monotropique. Le refroidissement lent ou rapide détermine les caractéristiques de la variété cristalline formée en termes de compacité, stabilité et point de fusion. Un refroidissement rapide favorise la formation de variétés cristallines métastables, constituant un réseau lâche et ayant un point de fusion bas par rapport à des conditions opératoires où le refroidissement est relativement lent (Ringuette, 1999 ; Cansell, 2005, Thivilliers, 2007).

La structure des TAG des corps gras diffère dans la longueur de leurs chaînes hydrocarbonées, qui représente un empilement de ces molécules sous forme de strates. L'épaisseur de ces strates donne le nombre de longueurs de chaînes dans la couche (2L, 3L, 4L, 5L ou 6L) (Figure 13) (Garti et Sato, 2001 ; Cansell, 2005 ; Larsson *et al.*, 2006 ; Sato et Ueno, 2011). En plus de l'influence des structures des chaînes et de la variété cristalline (arrangement latéral des chaînes hydrocarbonées), la conformation de la molécule de glycérol adoptant les conformations chaise (chair) et fourchette (tuning fork) est aussi importante et a une incidence directe sur le comportement du mélange (mixing behavior) des huiles et graisses végétales (Zhang *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2009 ; Sato et Ueno, 2011).

## **5.2. Facteurs influençant la cristallisation et le polymorphisme des lipides**

La structure des corps gras est influencée en grande partie par la composition biochimique des TAG. En outre, elle est largement dépendante des conditions physiques appliquées durant les procédés de transformation (process industriel). En particulier, la structure du réseau cristallin formé par ces triglycérides est fortement liée à l'historique thermique et de cisaillement du produit. Ces deux facteurs affectent les paramètres de cristallisation tels que les transferts de matière, de chaleur, la nucléation et la croissance des cristaux (Sato et Ueno, 2011 ; Marangoni et Wesdrop, 2012 ; Hartel, 2013 ; Maleky, 2015). La qualité d'un corps gras, ou d'un quelconque autre produit dont le taux de matière grasse est élevé, peut être optimisée à

travers le contrôle de la formation du réseau cristallin. Cette optimisation de la structure peut se faire par une démarche chimique (procédés d'interestérisation et d'hydrogénation), mais il est souvent plus pratique de contrôler les conditions physiques de transformation au niveau du process industriel. Il est donc nécessaire de comprendre l'influence des paramètres chimiques et physiques ainsi que leurs interactions sur la structure des corps gras (Maleky, 2015).

La présence de formes polymorphiques métastables et stables est influencé par les variations dynamiques de la température (chauffage et refroidissement). Ces effets peuvent modifier la présence de formes polymorphiques spécifiques, en adaptant des traitements thermiques efficaces afin de maintenir certaines formes polymorphiques dans le temps et éviter leur conversion en d'autres polymorphes à propriétés fonctionnelles moins importantes. De larges quantités de polymorphes plus stables sont formées lorsque le corps gras est chauffé ou refroidit lentement, alors que des polymorphes moins stables prédominent lorsque le chauffage ou le refroidissement augmente (Bayés-Garcia, 2015).

L'application d'un cisaillement augmente la cristallisation, la transformation des lipides et la modification des agrégats des nano-cristaux du réseau cristallin formé par les triglycérides (Marangoni *et al.*, 2012).

L'effet positif des additifs hydrophobes sur la cristallisation des lipides est attribué au phénomène dit « effet modèle » ou « templating effect ». Ce phénomène se produit lorsqu'un additif à point de fusion plus élevé, mais qui présente des similarités de structure et de composition chimique avec le lipide de la matrice grasse de départ, est ajouté pour servir de modèle (template) dans la cristallisation hétérogène des lipides. Cet additif va jouer le rôle de semence dans le processus de cristallisation. Par conséquent, il résulte une cristallisation précoce en raison de la nucléation des cristaux à températures élevées (Fredrick *et al.*, 2013 ; Maruyama *et al.*, 2014 ; Bayés-Garcia, 2015), une co-cristallisation de l'additif avec les TAG si sa concentration est suffisamment élevée (Verstringe *et al.*, 2013 ; Bayés-Garcia, 2015) et la promotion des formes polymorphiques les plus stables (Verstringe *et al.*, 2014 ; Bayés-Garcia, 2015).

Les principaux composés mineurs endogènes des corps gras (acides gras libres, monoacylglycérols, diacylglycérols et phospholipides) montrent un effet sur les différents stades de la cristallisation des lipides (nucléation et croissance des cristaux), mais aussi sur le comportement polymorphique. Cet effet est strictement dépendant de la similarité entre ces composés mineurs et les corps gras en présence. La similarité est surtout traduite en termes des

caractéristiques de la chaîne hydrocarbonée (longueur et nombre de doubles liaisons). Plus la similarité est élevée, plus l'effet est prononcé. Celle-ci permet l'intégration dans la matrice cristalline et/ou l'adhésion aux sites de croissance des cristaux. Ces différents mécanismes expliquent nettement le comportement d'un même additif dans différents corps gras (Smith *et al.*, 2011).

## **6. Techniques d'analyse instrumentale d'investigation**

### **6.1. Extraction des métabolites secondaires des plantes**

Les travaux portants sur les analyses qualitatives et quantitatives des molécules bioactives issues des matrices végétales reposent surtout sur un choix approprié et ciblé de la méthode d'extraction (Smith, 2003 ; Sasidharan *et al.*, 2011).

L'extraction est la première étape à considérer lors de l'étude de n'importe quelle plante objet de l'étude, jouant un rôle significatif et crucial dans l'obtention des résultats escomptés. Le plus souvent, les méthodes d'extraction font référence aux techniques de préparation des échantillons (Hennion *et al.*, 1998). C'est une étape importante et primordiale dans l'isolement, l'identification et l'utilisation des molécules bioactives telles que les polyphénols. Il n'existe pas une méthode singulière et standard pour l'extraction et son choix dépend de plusieurs paramètres (Baydar *et al.*, 2004 ; Bucic-Kojic *et al.*, 2007).

La plupart des extractions des composés bioactifs à partir des plantes sont de type solide-liquide. L'extraction solide-liquide peut être définie comme étant un transfert de matière (de masse), dans lequel les solides contenus dans la matrice solide migrent dans un solvant en contact avec cette dernière. Le phénomène de transfert de matière est affecté par les gradients de concentration, les coefficients de diffusion et la couche limite (Corrales *et al.*, 2009).

L'efficacité de l'extraction est fonction des conditions du procédé d'extraction mis en œuvre. Plusieurs variables influencent la concentration des composés cibles dans l'extrait : la température, le ratio solide-liquide, le débit, la taille des particules et le temps de contact (Pinelo *et al.*, 2004 ; Hayouni *et al.*, 2007 ; Ignat *et al.*, 2011).

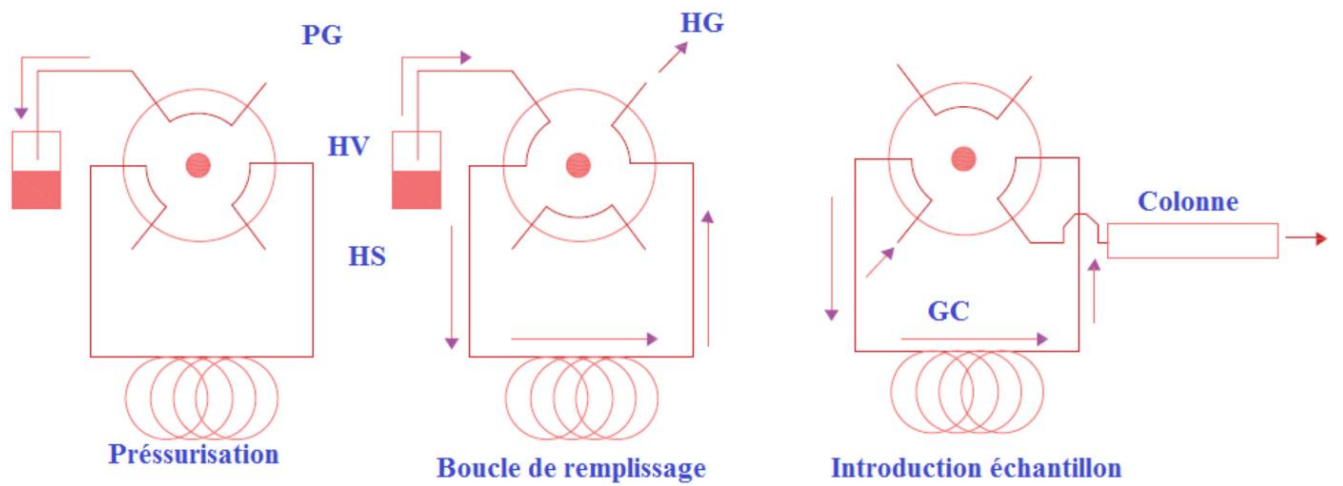
Les opérations de base mises en œuvre dans le procédé d'extraction sont le prélavage (si lieu est) de la matière végétale, séchage par la chaleur ou l'utilisation de l'azote (liquide ou gazeux) et broyage (homogénéiser l'échantillon et améliorer l'extraction en augmentant la surface de contact entre ce dernier et le système de solvants utilisés) (Sasidharan *et al.*, 2011). Cette procédure implique la co-extraction des substances non phénoliques telles que les sucres, les

acides organiques et les protéines, nécessitant ainsi des procédés de purification subséquents (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). Si la plante sélectionnée est utilisée dans l'usage traditionnel, il est nécessaire de préparer l'extrait de la même manière que celle décrite par cet usage pour mimer de la manière la plus proche possible la pratique traditionnelle correspondante (Fabricant et Farnsworth, 2001).

Différentes techniques d'extraction dans diverses conditions opératoires doivent être testées, afin de mieux saisir la sélectivité d'extraction à partir des différentes matrices végétales étudiées. Différentes techniques peuvent être utilisées pour l'extraction des composés bioactifs. Elles ont toutes des objectifs en commun : *i*) extraire le composé cible à partir d'une matrice végétale complexe, *ii*) accroître la sélectivité des méthodes analytiques, *iii*) augmenter la sensibilité du biotest en augmentant la concentration des composés cibles, *iv*) convertir le composé bioactif à analyser en une forme plus adéquate pour la détection et la séparation et *v*) fournir une méthode robuste et reproductible indépendante des variations au sein de l'échantillon étudié (Smith, 2003 ; Azmir *et al.*, 2013).

Il existe des techniques conventionnelles et des techniques non conventionnelles pour l'extraction des molécules bioactives. La plupart de ces techniques se basent sur le pouvoir extracteur des différents solvants communément utilisés ainsi que l'application combinée ou non du chauffage et de l'agitation. Les techniques conventionnelles ou classiques existantes sont : *i*) extraction par Soxhlet, *ii*) macération et *iii*) hydrodistillation pour les huiles essentielles (Azmir *et al.*, 2013).

Les techniques conventionnelles souffrent surtout de la durée d'extraction très longue, de la nécessité d'utiliser des solvants à pureté élevée et souvent coûteux, évaporation de quantités importantes de solvants, faible sélectivité d'extraction et dégradation thermique des composés thermolabiles (de Castro et Garcia-Ayuzo, 1998). Ainsi, des méthodes modernes d'extraction dites aussi « techniques non conventionnelles » ou encore « techniques vertes » ont pris place pour réduire la consommation en solvants organiques, limiter la dégradation de l'échantillon, éliminer les étapes additionnelles du nettoyage et de la concentration des échantillons avant l'analyse chromatographique et améliorer l'efficacité, sélectivité et cinétiques d'extraction. L'automatisation de ces techniques est aussi en faveur de leur utilisation pour tous types d'échantillons. Ces techniques sont : la micro-extraction en phase solide, l'extraction par fluides supercritiques, extraction liquide sous pression, extraction par champs électrique pulsé, extraction assistée par enzyme, extraction assistée par microondes et extraction assistée par ultrasons (Huie, 2002 ; Azmir *et al.*, 2013).



**Figure 14 :** schéma d'échantillonnage headspace. PG : gaz de pressurisation ; HV : vial (flacon) headspace ; HS : échantillon headspace ; GC : gaz porteur (Kolb, 1999).

Pour certains métabolites secondaires tels que les huiles essentielles et les composés d'arômes volatils, il y a différentes méthodes de préparation de l'échantillon avant analyse par chromatographie gazeuse. Parmi ces prétraitements on compte la technique de l'espace de tête ou « headspace ». C'est une technique généralement utilisée les échantillons volatils présents à l'état de traces (Ahuja et Jespersen, 2006).

Le headspace est une technique qui offre plusieurs avantages tels que rapidité, simplicité et élimination des résidus non volatils pouvant dégrader la colonne capillaire du chromatographe. Elle offre aussi la possibilité de récupérer les volatils à partir de l'échantillon à analyser de manière propre, rapide sans même utiliser de solvant pour l'extraction. L'échantillon (Figure 14) (solide ou liquide) est placé dans un flacon en verre (conçu spécialement pour cette technique), chauffé, avec suffisamment d'espace au-dessus de l'échantillon pour permettre à l'analyte d'atteindre l'équilibre entre la phase gazeuse et la phase solide (ou liquide) à l'intérieur du flacon. L'analyte se vaporise ainsi partiellement entre les deux phases et migre entre elle jusqu'à équilibre. Ceci forme un système dont la phase solide ou liquide est dite phase condensée, alors que la phase gazeuse constitue l'espace de tête ou headspace. L'équilibre thermodynamique n'est possible que si l'analyte (volatil mais soluble dans la phase condensée) est distribuée entre les deux phases. Deux techniques existent dans ce cas : statique et dynamique. Pour connaître la concentration initiale de l'analyte, il est primordial d'intégrer la constante d'équilibre dans la courbe d'étalonnage. Dans le cas contraire, la concentration de l'analyte est déterminée selon la procédure dite headspace à extractions multiples ou MHE (multiple headspace extractions) (Rouseff et Cadwallader, 2001 ; Kolb et Etre, 1997 ; Ahuja et Jespersen, 2006 ; Kolb et Etre, 2006).

## **6.2. Techniques d'étude des métabolites secondaires**

Un choix judicieux des méthodes d'extraction, des paramètres d'extraction de départ ainsi que la partie de la plante à extraire conditionne le succès de l'étape suivante qui est la caractérisation de ces métabolites. Le développement des techniques chromatographiques et spectrométriques modernes a rendu l'analyse des composés bioactifs nettement plus facile qu'autrefois (Poole *et al.*, 1990).

Malgré les nombreuses investigations, la séparation et la quantification des différents composés phénoliques restent une tâche difficile et compliquée, notamment la détermination simultanée de différents groupes polyphénoliques (Tsao et Yang, 2003). De ce fait, il y a un besoin croissant des méthodes analytiques de haute sensibilité et sélectivité pour la détermination des



composés phénoliques (Liu *et al.*, 2008). La sélection d'une stratégie analytique propre pour l'étude des composés phénoliques dans les matrices végétales dépend de l'objectif de l'étude, ainsi que de la nature de l'échantillon et de l'analyte. Les tests utilisés pour leur analyse concernent soit la détermination de la teneur en polyphénols totaux, soit la quantification d'un groupe ou d'une classe spécifiques de ceux-ci (Robards, 2003). Leur quantification est influencée par la nature chimique, la méthode d'extraction employée, la taille des particules de l'échantillon, les conditions et temps de stockage, le test utilisé, la sélection des standards et la présence de substances interférentes (cires, lipides, terpènes et chlorophylles) (Naczki et Shahidi, 2006).

### **6.2.1. Techniques spectrophotométriques**

Un certain nombre de méthodes spectrophotométriques ont été développées pour le dosage des composés phénoliques. Les tests utilisés sont basés sur différents principes et sont exploités pour déterminer les différents groupements structuraux présents dans ces derniers. Le test du Folin-Ciocalteu est largement utilisé dans la littérature scientifique pour le dosage des polyphénols totaux (Tsao et Yang, 2003 ; Lapornik *et al.*, 2005, Naczki et Shahidi, 2006 ; Ignat *et al.*, 2011), bien que le test du Folin-Denis soit également utilisé pour le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de plantes (Swain et Hillis, 1959). Le grand désavantage des tests spectrophotométriques est qu'ils donnent uniquement une estimation de la teneur en polyphénols totaux. Ils ne permettent pas la séparation des composés individuels et ne donnent pas d'estimation quantitative quant à leurs teneurs (Ignat *et al.*, 2011).

### **6.2.2. Techniques chromatographiques**

Le processus de caractérisation et d'identification des composés phytochimiques est dépendant de leur séparation, qui reste à ce jour un grand challenge. Ceci est lié au fait que les extraits de plantes présentent le plus souvent un mélange de composés phytochimiques de différentes polarités (Sasidharan *et al.*, 2011). Les méthodes séparatives utilisées au niveau du laboratoire incluent les différentes techniques chromatographiques et électrophorétiques, dont la sélectivité ne cesse d'augmenter avec l'introduction de nouveaux adsorbants, les diverses modifications chimiques au niveau de leurs surfaces et les méthodes de détection des composés séparés (Jork *et al.*, 1990). La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux (Rouessac et Rouessac, 2004).

### **6.2.2.1. Chromatographie couche mince/haute performance**

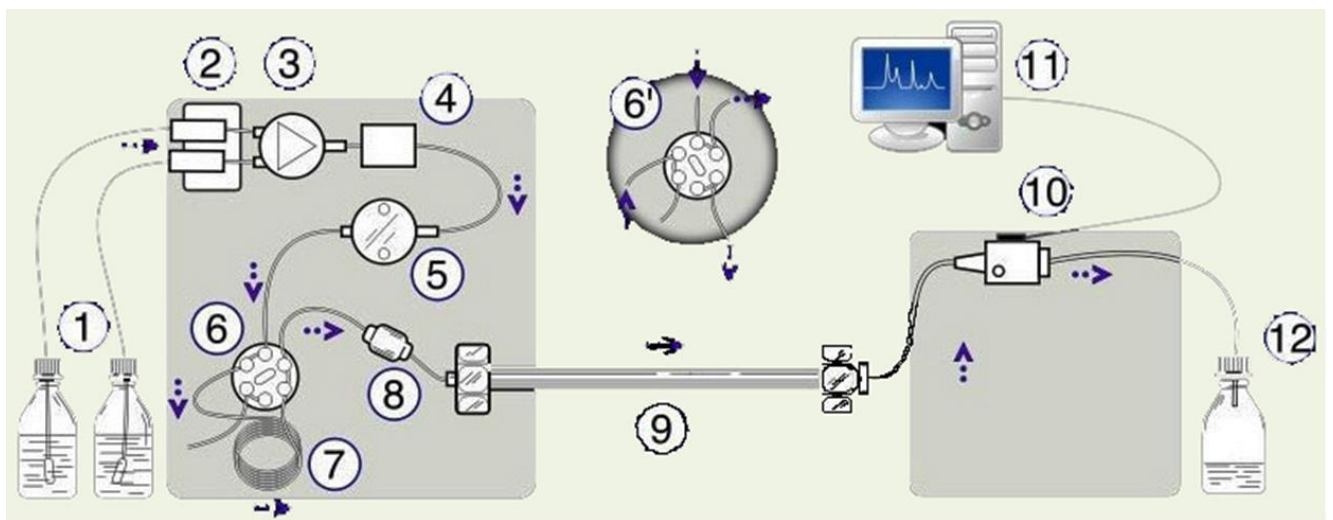
La chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC pour thin layer chromatography) est l'une des méthodes séparatives les plus populaires et les plus utilisées en raison de sa facilité d'utilisation, efficacité, sensibilité élevée, vitesse de séparation ainsi que sa capacité à analyser de multiples échantillons simultanément. Elle peut être utilisée pour la séparation, l'isolement, l'identification et la quantification des composés dans un mélange, mais aussi à l'échelle préparative pour la purification d'un composé individuel. En outre, le développement de la chromatographie sur couche mince a donné naissance à la chromatographie couche mince haute performance (CCMHP ou HPTLC pour high performance thin layer chromatography), permettant de profiter des avantages de la technologie moderne dont l'automatisation des outils d'analyse et l'utilisation de plaques plus petites offrant une meilleure sensibilité (Ahuja et Jespersen, 2006).

Bien que la TLC ou HPTLC n'ont pas le statut de remplacer en aucun cas la chromatographie liquide haute performance (comme méthode chromatographique majeure) ou bien qu'elle ait un statut supérieure, il existe des situations où elle présente une alternative plus intéressante par rapport aux autres techniques chromatographiques. C'est le cas des échantillons hautement concentrés (Dallas *et al.*, 1988).

La séparation des différentes classes de polyphénols des autres constituants du mélange des molécules de l'extrait brut est possible par TLC ou HPTLC. Différentes méthodes chromatographiques sont développées à cet effet. Aussi, les extraits bruts des plantes peuvent être sujets à un screening de l'activité antioxydante. Les composés de l'extrait brut de la plante ayant un caractère antioxydant et/ou possédant une activité antiradicalaire (activité scavenging) peuvent être distingués en utilisant ces techniques (Cimpoiu, 2006).

### **6.2.2.2. Chromatographie liquide haute performance**

De nos jours, le principal objectif des laboratoires de chimie analytique est de développer des méthodes chromatographiques fiables, rapides et efficaces pour les analyses qualitatives et quantitatives. La chromatographie liquide haute pression ou haute performance (CLHP ou HPLC pour high performance liquid chromatography) reste la technique de choix pour la séparation d'un mélange complexe de composés de haut et faible poids moléculaires, de différentes polarités et avec des propriétés acido-basiques diverses (Novakova et Vlckova, 2009). Les techniques HPLC conventionnelles sont confrontées à l'obligation de faire un compromis entre le temps et la résolution de la séparation chromatographiques.



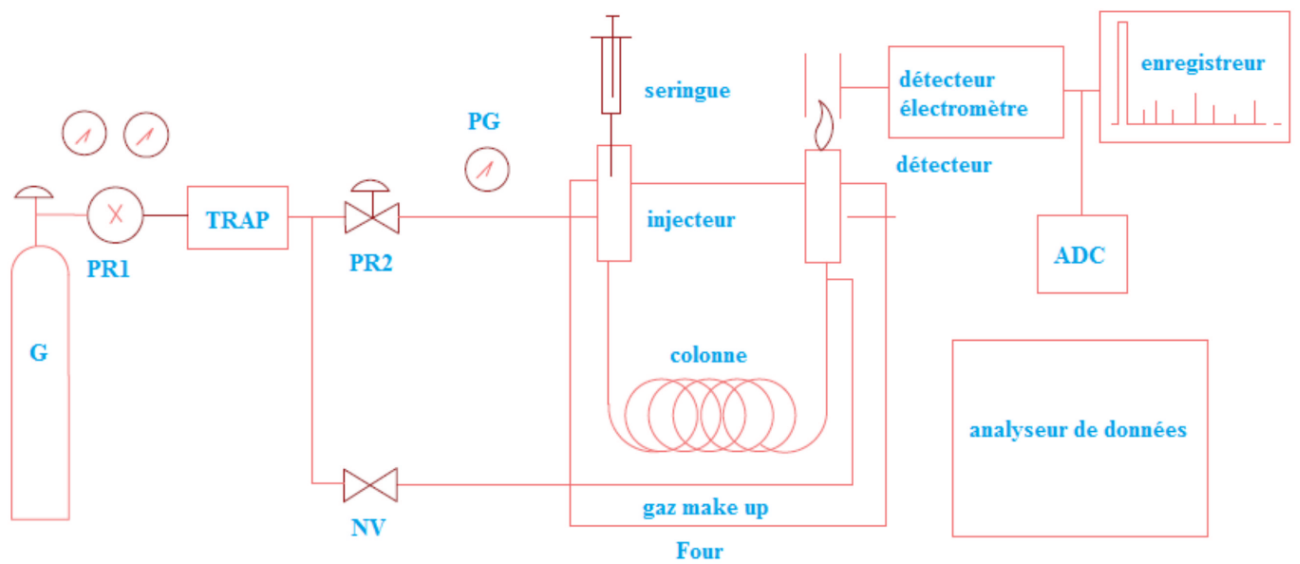
**Figure 15 :** schéma général d'un dispositif-type de chromatographie liquide haute performance 1) réservoirs des solvants ; 2) dégazeur ; 3) valve de gradient d'élution ; 4) doseur de phase mobile (ou éluant) ; 5) pompe à haute pression ; 6) vanne d'injection en position « inject » ; 6') vanne d'injection en position « load » ; 7) boucle d'injection de l'échantillon ; 8) précolonne (éventuelle) ; 9) colonne analytique ; 10) détecteur ; 11) acquisition du signal ; 12) décharge déchets (Penchev, 2010).

C'est ainsi que trois principales approches modernes ont été développées dans le but de réduire le temps de séparation, sans pour autant compromettre la résolution et l'efficacité de la séparation : *i*) l'utilisation des colonnes monolithiques, *ii*) chromatographie liquide à haute température et *iii*) chromatographie liquide à ultra-haute pression (Nguyen *et al.*, 2006 ; Wu et Clausen, 2007 ; Novakova et Vlckova, 2009).

Les composés phénoliques à faibles poids moléculaires peuvent être analysés par HPLC (Figure 15) sur colonnes à phase normale ou phase inverse. Cependant, ces techniques sont consommatrices de temps et peuvent montrer des résolutions médiocres à mesure que la longueur de la chaîne du polymère ou la diversité structurale augmentent. La détection des composés à hauts poids moléculaires, ainsi que la détermination de la distribution des masses moléculaires sont considérés comme des challenges majeurs dans l'analyse des polyphénols (Fulcrand *et al.*, 2008).

En plus des métabolites secondaires, la chromatographie liquide haute performance est une technique de séparation par excellence des métabolites primaires tels que les lipides et les protéines. La séparation des différentes classes de lipides ainsi que les espèces moléculaires de chacune de ces classes est effectuée sur HPLC. Ces dernières sont séparées avec succès par chromatographie liquide haute performance sur des colonnes à phase inverse (RP-HPLC) (Linskens et Jackson, 1989). Cette dernière est la technique la plus utilisée pour l'analyse des TAG dans les huiles et les graisses végétales et animales (Neff et Byrdwell, 1995 ; Castilho *et al.*, 2004). La caractérisation des TAG dans les mélanges naturels complexes incluant la détermination des différents types d'isomérisations, est une tâche délicate qui requiert la combinaison de divers modes de séparation, optimisation minutieuse des conditions de séparation et l'utilisation de techniques de détection appropriées (Holčapek *et al.*, 2009). Aussi, la détermination de la régio-spécificité des AG sur le squelette du glycérol joue un rôle important dans la séparation du mélange de TAG. Il est généralement admis que les AG estérifiés en position *sn*-3 sont moins abondants par rapport aux autres positions. En outre, il est constaté que l'acide palmitique est absent en position *sn*-2 dans les triglycérides des huiles végétales (Castilho *et al.*, 2004 ; Zeb et Murkovic, 2010).

Le principe de fractionnement chromatographique est basé sur l'interaction des protéines ou des peptides avec le support solide (phase stationnaire) et la phase mobile. Cette interaction peut se faire entre autres par partage en phase reverse ou inverse. Le fractionnement est réalisé en utilisant un gradient dans la phase mobile, où les protéines ou peptides sont élués en changeant la concentration de l'adjuvant organique avec le temps (chromatographie en phase



**Figure 16** : schéma de base d'un chromatographe ; G : gaz comprimé; PR1 : régulateur de pression à deux étages ; PR2 : contrôleur de flux ; NV : vanne de contrôle ; PG : pression de gaz ; ADC : analyse des données chromatographiques ; TRAP : diviseur de flux.

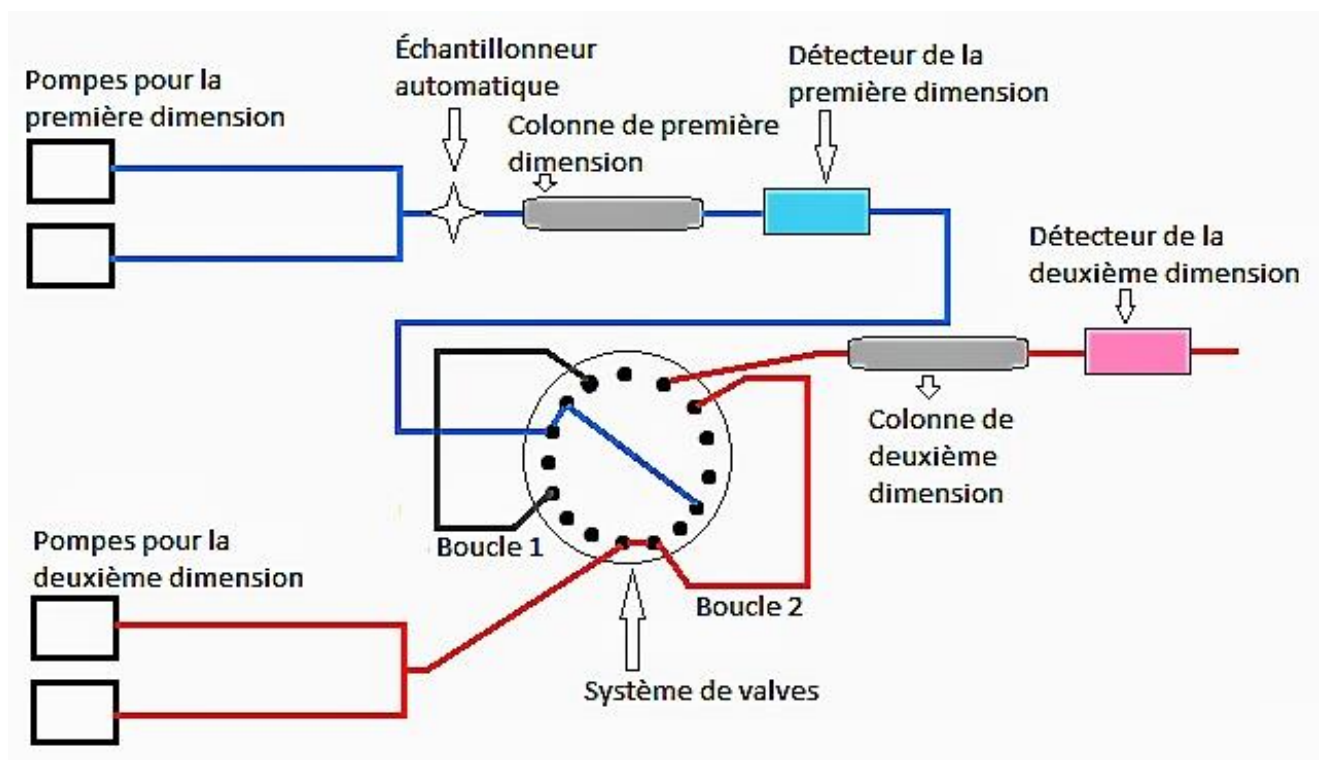
inverse) par exemple. Il est également possible de combiner deux mécanismes de séparation en HPLC et utiliser différents systèmes de détection (UV-Vis et spectrométrie de masse). Le plus souvent, les couplages en deux dimensions sont favorisés pour améliorer les séparations (Issaq *et al.*, 2002). En effet, la complexité de certaines macromolécules telles que les protéines rend leur séparation délicate en chromatographie liquide à une seule dimension. La chromatographie liquide à deux dimensions permet une meilleure résolution de leur séparation (Bedani *et al.*, 2012).

### **6.2.2.3. Chromatographie en phase gazeuse**

Plusieurs composés alimentaires sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (Figure 16), lui permettant ainsi d'être l'une des techniques analytiques principales en biochimie alimentaire. A partir d'un mélange de molécules, elle permet leur séparation par partition entre phase mobile gazeuse et phase stationnaire. Alors que l'usage de l'HPLC est préconisé pour les molécules non volatiles ou thermolabiles, la GC est une meilleure alternative pour l'analyse des composés volatils (Gordon, 1990).

La chromatographie gazeuse est utilisée pour l'analyse des volatils. Les temps de rétention sont utilisés comme critères primaires pour l'identification des pics. Sans ces derniers, l'identification est pratiquement impossible. Dans certains cas, même si le temps de rétention pour un composé est connu il est possible qu'un autre composé dans l'échantillon co-élue au même temps de rétention (Oprean *et al.*, 1998). C'est la technique de séparation de choix pour les huiles essentielles, car elle permet la détection des constituants individuels des huiles essentielles même pour de très faibles volumes d'échantillons (Paolini, 2005).

Certains lipides, comme les AG libres à courte chaîne ( $C_2$  à  $C_6$ ), peuvent être analysés sans dérivatisation préalable. Cependant, la majorité des lipides doivent être dérivatisés avant analyse et ce en raison de leur faible volatilité ou instabilité thermique. La procédure détaillée de l'IUPAC met en avant la saponification des lipides en milieu alcalin comme étape préliminaire avant analyse. Les extraits des TAG sont hydrolysés avec libération d'AG estérifiés en présence de méthanol et de trifluorure de bore. Les esters méthylés d'AG ou FAME (fatty acids methyl esters) sont par conséquent extraits par un solvant organique, et analysés par GC à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme ou FID (flame ionization detector). Cette technique est utile également pour l'authentification des huiles et la détection des fraudes en comparant les pics et leurs hauteurs dans les composés analysés (Lee *et al.*, 1998).



**Figure 17** : différentes parties d'un chromatographe bidimensionnel (Drouin, 2015).

#### **6.2.2.4. Chromatographie en phase gazeuse à deux dimensions**

La chromatographie gazeuse (GC) a toujours été reconnue, depuis sa première apparition, comme une technique qui offre de grandes capacités de pics par rapport aux autres techniques chromatographiques. La GC monodimensionnelle (1D GC) sépare de 100-150 pics dans une analyse. Cependant, ceci n'est guère suffisant quand il s'agit de séparer plusieurs constituants individuels de plusieurs types d'échantillons. Pour améliorer le pouvoir de séparation d'un système GC de manière efficace, un couplage de deux colonnes indépendantes à travers une interface est réalisé : c'est la chromatographie gazeuse bidimensionnelle (2D GC ou GCxGC) (Adahchour *et al.*, 2006).

La séparation chromatographique en phase gazeuse à deux dimensions (GCxGC) (Figure 17) fait appel à deux colonnes capillaires (pouvant être placées dans un même four ou dans deux fours différents), disposées en série avec un module de transfert situé en tête de la seconde colonne capillaire. La première colonne est généralement apolaire et la séparation chromatographique des composés s'effectue sur la base de leurs points d'ébullition. La seconde colonne est polaire et les composés séparés dans la première dimension (première colonne) sont séparés une fois encore, mais cette fois-ci les analytes ayant la même volatilité seront séparés sur la base des interactions (dipole-dipole, liaisons hydrogène et effets de polarisabilité). La combinaison des deux colonnes selon la disposition apolaire-polaire est dite « configuration orthogonale » (Mondello *et al.*, 2008).

L'énorme bénéfice de la GCxGC est l'augmentation du nombre de pics chromatographiques pouvant être détectés en GC. Pour un échantillon complexe, des problèmes spécifiques de la séparation sont maintenant résolus grâce à cette technique. Il est ainsi possible de présenter plusieurs autres pics dans un seul chromatogramme, en raison de l'expansion de l'espace disponible pour la séparation. Pour des échantillons présentant des mélanges simples ou complexes de composés, il est constaté que cette technique augmente la sensibilité de détection mais aussi la résolution des pics (Ong et Mariott, 2002). Par rapport à la monodimensionnelle (1D GC) elle permet un pouvoir de séparation poussé, améliorer la sensibilité de détection de la masse et obtention de chromatogrammes nettement ordonnés et structurés. Ceci conduit à une quantification et/ou identification assez fructueuse (Panič et Górecki, 2006).

La seule différence du point de vue instrumental entre les couplages GC-MS et GCxGC est l'utilisation d'une seconde colonne dans la seconde dimension à la place de l'analyseur de masse. Dans les deux cas, les fractions de l'échantillon éluées à partir de la colonne capillaire



du GC sont collectées au niveau du second compartiment de séparation. La GC-MS utilise un analyseur de masse dans le second compartiment de séparation pour générer une série de spectres de masse à partir des fractions éluées. Par contre, la GCxGC utilise une seconde colonne capillaire comme second compartiment de séparation pour générer une série de chromatogrammes à partir des fractions éluées de la première colonne (Phillips et Beens, 1999).

### **6.2.3. Electrophorèse**

L'électrophorèse requiert deux exigences de base pour son fonctionnement : la présence d'un milieu semi-conducteur et la présence d'un champ électrique. Le milieu semi-conducteur peut s'agir d'un papier imbibé dans un électrolyte ou d'un gel placé dans un électrolyte (Ahuja et Jespersen, 2006).

La migration des protéines dans un gel d'électrophorèse dépend de deux paramètres importants : la mobilité électrophorétique de la protéine et la résistance du milieu à cette migration. Il y a plus d'un demi-siècle, les scientifiques ont réalisé qu'il est possible de séparer un mélange complexe de protéines par le biais de l'électrophorèse monodimensionnelle (Issaq *et al.*, 2012).

Quand les protéines sont solubilisées en présence du détergent sulfate de sodium dodécyl ou SDS (sodium dodecyl sulfate) soumises à une électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS ou SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), une bonne corrélation est obtenue entre la distance de migration et le poids moléculaire (Swank et Munkres, 1971).

### **6.2.4. Spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse (SM ou mass spectrometry MS) diffère des techniques spectroscopiques, dans la mesure où elle utilise les caractéristiques physiques et chimiques des molécules. Dans sa forme initiale, elle accomplit trois fonctions principales : *i*) l'ionisation des molécules, *ii*) la séparation des molécules selon le rapport masse/charge ( $m/z$ ) et *iii*) l'abondance de chaque ion produit (Paré et Bélanger, 1997). Cette dernière est représentée dans un graphe appelé « spectre de masse ». Deux types de spectres sont utilisés : le spectre continu (profil) de l'intervalle de masses choisi et le spectre de fragmentation (spectre barres ou encore dit diagramme en bâtonnets) correspondant au tracé le plus couramment utilisé comme présentation normalisée en analyse. Le composé qui subit une fragmentation donne un spectre

de masse reproductible dans les mêmes conditions opératoires. Il est par contre détruit en fin d'analyse (Rouessac et Rouessac, 2004).

Cette technique prodigue des informations qualitatives et quantitatives quant à la matière analysée (organique ou inorganique) dont la composition élémentaire, la structure moléculaire et la composition de mélanges complexes. Le boom que cette technique a connu depuis les années 1940s a permis notamment son couplage avec les techniques de séparation les plus puissantes, en l'occurrence la chromatographie gazeuse (GC-MS) et la chromatographie liquide (LC-MS). La naissance des nouvelles techniques d'ionisation est responsable également de ce boom, la rendant essentielle dans toutes les disciplines de recherche confondues (Ahuja et Jespersion, 2006).

La MS est une technique analytique qui permet d'élucider les structures chimiques de diverses molécules (polyphénols, peptides, substances volatiles). Elle consiste en l'ionisation des composés pour générer des molécules ou fragments de molécules afin de déterminer leurs  $m/z$  (Ignat *et al.*, 2011). Les composés phénoliques sont détectés en spectrométrie de masse par bombardement par atomes rapides ou FAB (fast atom bombardment), ionisation électronique par l'intermédiaire de sprays ou ESI (electrospray ionization), ionisation chimique à pression atmosphérique ou APCI (atmospheric pressure chemical ionization), photo-ionisation à pression atmosphérique ou APPI (atmospheric pressure photo ionization) et ionisation laser assistée par matrice ou MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) (Fulcrand *et al.*, 2008 ; Ignat *et al.*, 2011).

La spectrométrie de masse peut être exploitée comme technique à double rôle : *i*) de séparation, séparant les ions moléculaires et les fragments de l'analyte sur la base de leurs masses et *ii*) comme technique spectrométrique, car les spectres de fragmentation sont assimilés à des empreintes digitales spécifiques de la molécule (Mondello *et al.*, 2008).

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS ou MS<sup>n</sup>) a été développée avec l'introduction et la généralisation des techniques d'ionisation dites « soft ». Contrairement à la spectrométrie de masse traditionnelle, elle permet de sonder les caractéristiques des ions fragments issus de la décomposition des composés moléculaires à analyser. En outre, elle permet l'analyse directe des composés organiques et biologiques cibles dans les mélanges complexes (Rouessac et Rouessac, 2004 ; Ahuja et Jespersion, 2006).

## **6.2.5. Techniques d'étude et de caractérisation du polymorphisme**

### **6.2.5.1. Analyse calorimétrique différentielle à balayage**

L'analyse thermique adopte un ensemble de techniques (thermogravimétrie, dilatométrie, thermomécanique, thermo-optique et calorimétrie) dans lesquelles la propriété d'une substance étudiée est déterminée en fonction de la température et du programme de température appliqués. Ces techniques permettent l'évaluation du comportement des matrices liquides, solides cristallines ou amorphes, mais aussi des changements physiques et chimiques dans un environnement contrôlé en termes de variation de température. Les événements se produisant sont enregistrés dans un thermogramme et peuvent être endothermiques (fusion, ébullition, sublimation, évaporation, désolvantation, transitions de phase solide-solide et dégradation chimique) ou exothermiques (cristallisation et décomposition oxydative). Des paramètres physiques et des propriétés structurales sont déterminés (Ahuja et Jespersen, 2006 ; Relkin, 2006).

La calorimétrie différentielle à balayage ou DSC (differential scanning calorimetry) est une technique thermoanalytique, qui permet de suivre les changements des propriétés physiques et chimiques des matériaux en fonction de la température. Ceci se base sur la détection des changements de chaleur associés aux processus relatifs aux propriétés évoquées (Biliaderis, 1983). La mesure des changements d'absorption de la chaleur en fonction de la température de l'échantillon permet l'obtention d'un profil de fusion pour celui-ci dans lequel est retracé son historique thermique (passage par divers états cristallins lors de la transition de phase solide-liquide) (O'Brien, 2008).

L'application de la DSC dans les échantillons alimentaires et biologiques présente plusieurs avantages, car cette technique calorimétrique ne nécessite pas une expérimentation exhaustive dans le temps. En outre, l'échantillon ne subit aucun traitement chimique pour sa préparation (non utilisation de produits chimiques pouvant présenter des risques pour le manipulateur et l'environnement). Elle est également utilisée pour les tests de stabilité oxydative et la détermination de la durée de vie de produits alimentaires (Chiavaro, 2014).

### **6.2.5.2. Résonance magnétique nucléaire**

La résonance magnétique nucléaire (RMN ou nuclear magnetic resonance NMR) est considérée comme une méthode spectroscopique polyvalente et incontournable dans les domaines les plus

divers (chimie et biologie). Elle est impliquée dans l'analyse quantitative mais aussi structurale et permet d'analyser les échantillons à l'état liquide ou solide (Rouessac et Rouessac, 2004).

De manière similaire aux autres formes de la spectroscopie moléculaire, le phénomène de la RMN est associé à l'absorption et à l'émission de l'énergie. Par contre, la différence avec les autres spectroscopies est que l'absorption de l'énergie en RMN a lieu uniquement dans un champ magnétique. Ainsi, certains noyaux atomiques se comportent comme des barreaux magnétiques microscopiques (Paré et Bélanger, 1997) et la RMN résulte de l'absorption de l'énergie par un noyau changeant son orientation de spin dans un champ magnétique. Généralement, les protons sont les noyaux les plus étudiés et leurs spectres de résonance sont caractéristiques des divers groupes dans la molécule (Van Holde, 2006).

La technique RMN pulsée basse résolution ou p-NMR (pulsed nuclear resonance magnetic) utilise un champ magnétique continu externe, ainsi qu'une pulsation de radiofréquence qui interagit avec les moments magnétiques naturels de l'échantillon. Les temps de relaxation du noyau d'hydrogène associés à ces événements sont mesurés en fonction du temps (Chiavaro, 2014). La quantité de solide formée suite à la cristallisation des TAG dans les corps gras est déterminée par p-NMR et est définie comme étant le taux de solide (SFC pour solid fat content). Le calcul de celui-ci se base sur les différents temps de relaxation des noyaux présents dans la phase liquide par rapport à ceux dans la phase solide. Les noyaux dans la phase liquide relaxent plus lentement (70  $\mu$ s) par rapport à ceux de la phase solide (< 10  $\mu$ s) (Hui *et al.*, 2006, Chiavaro, 2014).

### **6.2.5.3. Microscopie à lumière polarisée**

L'étude de la microstructure cristalline des corps gras devient de plus en plus d'importance capitale car les propriétés fonctionnelles de plusieurs aliments dépendent de leur structure fine. La microstructure est fortement dépendante de la composition du corps gras, du comportement à la cristallisation (polymorphisme) et des caractéristiques de la microstructure qui déterminent les propriétés physiques de celui-ci. Le succès du processus de mesure par la microscopie nécessite le respect d'étapes primordiales : *i*) obtention d'une image véritablement représentative de l'échantillon à analyser, *ii*) un choix judicieux de la méthode d'analyse pour ce dernier et *iii*) interprétation des données (Gioielli *et al.*, 2003).

La microscopie à lumière polarisée PLM est une technique de la microscopie optique, communément utilisée pour évaluer la microstructure des réseaux cristallins formés lors de la cristallisation. Elle est particulièrement utile pour évaluer les premiers stades de la

**A****B****C****D****E**

**Figure 18** : photographies du Pituranthos à balai (*P. scoparius*) (*Pituranthos scoparius* dite aussi *Deverra scoparia* (Coss & Durieu) Benth. & Hook. ex Schinz). (A) tiges de la plante s'élançant dans tous les sens, (B) ombelle de la plante (vue d'en bas), (C) tiges et fleurs de la plante, (D) ombelles avant floraison, (E) ombelles après floraison (Msanda, 2017).

crystallisation, pouvant détecter de minuscules cristaux (1-3  $\mu\text{m}$ ) (Chiavaro, 2014). Elle permet une observation directe des cristaux de TAG dans l'échantillon grâce à leur biréfringence : la phase solide non isotropique réfracte la lumière différemment par rapport à la phase liquide isotropique. Les cristaux apparaissent alors brillants (blanchâtres) entre deux filtres polarisés croisés, alors que l'huile liquide devient obscure (fond gris-noir ou noirâtre) (Narine et Marangoni, 1999 ; Acevedo et Marangoni, 2015).

Les cristaux des corps gras vu sous la lumière du microscope sont au fait des clusters de plusieurs cristaux individuels. Un refroidissement rapide engendre de petits cristaux, alors qu'un refroidissement lent produit de grands cristaux très visibles. Cependant, ce sont les conditions du process qui déterminent la taille des clusters et non la taille des cristaux (Timms, 1984).

Le diamètre des cristaux doit être inférieur à 30  $\mu\text{m}$  pour les huiles et les graisses destinées pour des applications dans des produits alimentaires, afin de prévenir la sensation graineuse dans la bouche. La dispersion cristalline sous forme de petits cristaux (en nombre important dans le corps gras) favorise le développement de propriétés désirables et recherchées dans le produit, telle que la tartinabilité (Herrera *et al.*, 1998).

## **7. Description botanique et synthèse des travaux réalisés sur les plantes étudiées**

### **7.1. Le Pituranthos à balai (*Pituranthos scoparius*)**

Le Pituranthos à balai possède deux noms scientifiques évoqués dans la littérature et qui sont : *Pituranthos scoparius* (Coss. & Dur.) Benth. et Hook ou *Deverra scoparia* (Coss. & Dur.) Benth. et Hook (Figure 18). Il a différents usages compte-tenu de ses caractéristiques biochimiques (Tableau 1A). Sa valorisation dans la présente thèse est justifiée par le nombre de travaux limité en Algérie quant à son huile essentielle (Tableau 1B), ainsi que ses extraits (Tableau 1C) pour ce qui est de son utilisation à des fins de conservation alimentaire.

C'est une plante qui appartient à la famille Apiaceae connue autrefois sous le nom d'Ombellifères (Umbelliferae) et constituant une grande famille de plantes à fleurs, habituellement aromatiques et qui poussent dans les zones tempérées (hémisphère nord). Il existe approximativement 300 genres et 3000 espèces pour cette famille à travers le monde (Quezel et Santa, 1963). Il a été recensé 55 genres regroupant 117 espèces, parmi lesquelles 24 sont répertoriées comme plantes endémiques en Algérie (Quezel et Santa, 1963 ; Hammoudi, 2015). Les membres de cette famille forment des fleurs en ombelles (d'où leur ancien nom

d'Ombellifères). Ces plantes sont bisannuelles ou vivaces. Le nombre de pétales, sépales et étamines d'une fleur individuelle dans une ombelle est de 5. Une des caractéristiques botaniques de cette famille est les pétioles de feuilles qui engainent habituellement la tige (Glimn Lacy et Kaufman, 2006). Les plantes de cette famille sont communément utilisées comme aliments, agents aromatisants et pour leurs vertus médicinales. En particulier, les graines des plantes de cette famille sont connues pour être utilisées comme remèdes ménagers contre l'hypertension. Elles possèdent une odeur piquante ou aromatique caractéristiques, relatives à la présence des huiles essentielles dans les feuilles, tiges et fleurs de ces plantes. Ceci leur permet d'avoir une large application en aromathérapie (Gilani *et al.*, 2005 ; Glimn Lacy et Kaufman, 2006 ; Saleem, 2010 ; Sahebkar et Iranshahi, 2011 ; Acimovic *et al.*, 2015). Les propriétés fonctionnelles des Apiacées proviennent et/ou sont déterminées par les fonctions de leurs huiles essentielles. Elles possèdent une forte activité antibactérienne contre une large gamme de pathogènes. Les composés actifs dans les huiles essentielles sont efficaces contre plusieurs bactéries à Gram positif et négatif, permettant ainsi de les exploiter au profit des industries agroalimentaires pour lutter contre les pathogènes contaminants des produits alimentaires (Orhan *et al.*, 2009; Oroojalian *et al.*, 2010 ; Acimovic *et al.*, 2015). Les antioxydants issus de ces plantes permettent de lutter contre les effets pathologiques délétères des radicaux libres (Christova-Bagdassarian *et al.*, 2013 ; Jeyabalan *et al.*, 2015, Acimovic *et al.*, 2015).

**Tableau 1A** : aperçu général des caractéristiques botaniques, géographiques et thérapeutiques du *Pituranthos* à balai (*P. scoparius*) (Quézel et Santa, 1963 ; Ozenda, 1991 ; Bellakhdar, 1997 ; Ghrabi, 2005 ; Hammiche et Maiza, 2006 ; Boudjelal *et al.*, 2013 ; Adida *et al.*, 2016).

Caractéristiques et propriétés	Pituranthos à balai
<b>Noms scientifiques</b>	<i>P. scoparius</i> (Coss. & Dur.) Benth. et Hook ou <i>Deverra scoparia</i> (Coss & Durieu) Benth. & Hook. ex Schinz.
<b>Noms vernaculaires</b>	Tattai (ou Tattayt) et Guezzah (ou Kozah)
<b>Classification botanique</b>	Règne : Végétal ; embranchement : Spermaphytes ; sous-embranchement : Angiospermes ; classe : Eudicotylédones ; ordre : Apiales ; famille : Apiacées ; genre : <i>Pituranthos</i> , espèce : <i>Pituranthos scoparius</i> .
<b>Description botanique</b>	<i>P. scoparius</i> est une plante vivace. Les tiges (40-80 cm) sont érigées, florifères à ombelles latérales et à pédoncule court (1-3 cm). Elles forment des touffes denses qui envoient des branches raides latéralement courtes. Elles sont totalement aphyllées. Les fleurs, assez souvent avec un pédoncule court, montrent des pétales blancs, de veines étroites, sont groupées en ombelles latérales assez étalées avec 4-8 rayons grêles. Les fruits sont plus longs que larges, hérissés de poils dressés. Le fruit est un méricarpe globulaire de 1,3 mm de long. Les feuilles supérieures sont réduites à leurs graines, se terminant par un point.
<b>Distribution géographique et écologie de la plante</b>	Espèce endémique de l'Afrique du nord, du tripolitaine au Maroc et vers le Sud au Sahara central. Assez fréquente dans les hauts plateaux du Tassili des Ajers (N'ajjer), le Hoggar, l'Atlas Saharien et le Sahara septentrional. En Algérie, elle est très répandue dans les hauts plateaux et dans beaucoup de régions sub-sahariennes et sahariennes. Elle est également répandue en Tunisie, dans la vallée de Medjerda, la crête dorsale, le centre et le sud tunisiens. C'est l'une des espèces à large distribution parmi les Apiacées (ombellifères anciennement), rencontrée dans les berges des fleuves généralement.
<b>Composés rencontrés dans la plante</b>	Les racines contiennent du mannitol et des isocoumarines, alors que les graines, tiges et fleurs contiennent des terpénoïdes issus des huiles essentielles.
<b>Usage en médecine traditionnelle</b>	Deux modes d'emploi sont prépondérants parmi les populations locales : l'infusion et la décoction. Leurs extraits sont utilisés à diverses fins médicinales : pour les maux de tête, diarrhées et pour le traitement de l'eczéma. D'autres utilisations comprennent aussi : les soins post-partum (spasmes des douleurs), diabète, hépatite, difficultés et troubles digestifs (maux de l'estomac, de l'abdomen et indigestion), asthme et infections urinaires. Les tiges et les feuilles sont employées pour le traitement de la rougeole, du rhumatisme et de l'ictère. Efficace contre les morsures de vipères et les piqûres des scorpions.
<b>Pharmacologie et toxicité</b>	Les isocoumarines augmentent l'activité anti-tumorale de radiothérapie. La plante cause des réactions allergiques chez les animaux.



**Tableau 1B** : synthèse des travaux réalisés sur l'huile essentielle de *P. scoparius*.

Intitulé de la publication	Résultats obtenus
GC-MS analysis of the volatile constituents of the essential oils of <i>P. scoparius</i> (Coss & Dur.) Benth. & Hook. from Algeria (Vernin <i>et al.</i> , 1999).	Les composés des huiles essentielles (HEs) des tiges et des graines ont été identifiés (94) : monoterpènes hydrocarbonés (34), oxydes (2), aldéhydes (8), cétones (10), alcools (24), dérivés phénoliques (9) et composés divers (7). Plusieurs des sesquiterpénoïdes n'ont pas été identifiés. L' $\alpha$ -pinène (34%) et l'apiole (15%) sont les composés majoritaires dans l'HEs des tiges, alors que apiole (52%), bornyl acétate (21%) et $\alpha$ -pinène (11%) sont les composés majoritaires de l'HEs des graines.
Comparative antibacterial activities of the essential oils of stems and seeds of <i>P. scoparius</i> from Algerian septentrional Sahara (Boutaghane <i>et al.</i> , 2004).	Les HEs des tiges et des graines de deux régions ont été caractérisées. 11 composés ont été identifiés (région de Ghardaia), dill apiole (12,2%) (graines) et le germacrène D (12,7%) (tiges) sont les composés dominants. Par contre, 5 composés ont été identifiés (Ain Diss) dont l'apiole (52,8%) (graines) et l' $\alpha$ -pinène (34%) (tiges) sont les composés dominants. Ces HEs ont montré des activités antibactériennes vis-à-vis de souches bactériennes pathogènes de référence.
Composition of seeds and stems essential oils of <i>P. scoparius</i> (Vérité <i>et al.</i> , 2004)	Les HEs des tiges et des graines (récoltées dans la région de Ghardaia) ont été déterminées par GC-MS. 58 composés ont été identifiés. Les composés majoritaires dans les premières (tiges) sont le germacrène D (12,7%), limonène (9,8%) et myristicine (7,2%) alors que dans les secondes (graines) dill apiole (12,2%), Limonène (11,2%) et myristicine (11,1%).
Etude phytochimique de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>P. scoparius</i> de la région de Biskra (Sud-Est Algérien) (Abderrazak <i>et al.</i> , 2013)	Les HEs de deux régions de Biskra (Kantra et Méchouneche) ont été caractérisés. 10 composés ont été identifiés dont les composés majoritaires sont : $\alpha$ -pinène, sabinène, dill apiole et myristicine. Ces HEs ont montré des activités antibactériennes à l'égard de bactéries à Gram positif et Gram négatif, ainsi que sur une levure.
Variation of essential oils composition of <i>P. scoparius</i> in Algeria (Lograda <i>et al.</i> , 2013).	Les HEs des parties aériennes de <i>P. scoparius</i> de quatre régions ont été caractérisées par GC-MS pour leur contenu terpénique (nombre et concentrations) : Boussâada (M'Sila) (51), T'Kout (Batna) (47), Kantra (40) et Méchouneche (Biskra) (28). Trois profils chimiques ont été dégagés par cette étude : le profil limonène qui caractérise les régions du sud algérien (région de Ghardia), le profil dill apiole caractérisant les régions plus au nord (régions de Djelfa et Laghouat) et le profil sabinène caractérisant le nord-est du pays (régions de Biskra et Batna).
Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles de <i>Deverra scoparia</i> Coss. & Dur. (Apiaceae) (Hammoudi <i>et al.</i> , 2015).	Les HEs des parties aériennes de la plante (région de Tamanrasset du sud algérien) ont été extraites. 22 constituants ont été identifiés par GC-MS, dont les composés majoritaires sont l' $\alpha$ -bornyl acétate (31,99%) et l' $\alpha$ -pinène (12,05%). Une forte activité antiradicalaire ( $EC_{50}$ évaluées pour DPPH $\cdot$ (2,99 $\mu$ g/mL) et ABTS $\cdot^+$ (1,12 $\mu$ g/mL)) a été rapportée.
Volatile compounds and biological activities of aerial parts of <i>P. scoparius</i> (Coss. & Dur.) Schinz (Apiaceae) from Hoggar, southern Algeria (Ksouri <i>et al.</i> , 2017).	Les HEs issues de la partie aérienne de la plante sont constituées de 46 composés détectés par GC-MS, dont les composés majoritaires sont le limonène (46,9%) et le 1,8-cinéole (7,6%). Elles ont démontré une activité antioxydante ( $IC_{50}$ de 11,21 mg/mL). L'effet sur un panel de microorganismes (bactéries à Grams positif et négatifs, levure et moisissures) est estimé de faible à fort, dépendant de la souche étudiée.
Chemical variability of the essential oil of <i>P. scoparius</i> from Algeria (Malti <i>et al.</i> , 2018).	Les HEs de l'étude sont issues de quatre régions du pays : Batna, Biskra, Ghardaia et Béchar. 93 échantillons, pour une période allant de septembre à Janvier, ont été analysés par GC-FID, GC-MS et $^{13}C$ -NMR. Le profil chimique varie en fonction de la région de collecte de la plante et les composés majoritaires varient en fonction du groupe caractérisé.

**Tableau 1C** : synthèse des travaux réalisés sur les différents extraits (aqueux, hydroalcooliques ou organiques) de *P. scoparius* en Algérie.

Intitulé de la publication	Résultats obtenus
Alkylated isocoumarins from <i>P. scoparius</i> (Hamada <i>et al.</i> , 2004).	Les racines de <i>P. scoparius</i> (récoltée dans la région de Biskra) ont constitué le point de départ pour l'obtention d'un extrait d'acétate d'éthyle. La caractérisation des molécules de l'extrait a été réalisée par la <sup>1</sup> H- et <sup>13</sup> C-NMR. Deux isocoumarines ont été isolées de l'extrait : 3-n-propyl-5-methoxy-6-hydroxy-isocoumarin et 3-n-propyl-5,7-dimethoxy-6-hydroxy-isocoumarin.
Five glycosylated flavonoids from the antibacterial butanolic extract (Benmekhbi <i>et al.</i> , 2008).	La partie aérienne de <i>P. scoparius</i> (recueillis dans la région de Ghardaia) a subi plusieurs étapes d'extraction pour aboutir à un extrait butanolique. et a été caractérisé par <sup>1</sup> H-NMR. 5 flavonoïdes glycosylés ont été identifiés, dont deux pour la première fois : apigenin-7-O-glucoside (apigetrin), apigenin-7-O-rhamnoside (isolés pour la première fois), sorhamnetin-3-O-rutinoside, isorhamnetin-3-O-glucoside et apigenin-6,8-di-C-glucoside (vicenin-2). Cet extrait a été testé sur un panel de 6 bactéries (4 à Gram négatif et 2 à Gram positif). Une forte activité antibactérienne a été montrée à l'égard d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 et <i>Staphylococcus aureus</i> .
Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavone glucoside isolated from <i>Deverra scoparia</i> (Djeridane <i>et al.</i> , 2008).	Les parties aériennes de <i>P. scoparius</i> (recueillis dans l'Atlas saharien à 40 km de la région de Laghouat). Une substance bioactive a été purifiée par chromatographie semi-préparative (HPLC semi-préparative), dans l'extrait méthanolique final (une succession de plusieurs extractions par différents solvants) et caractérisée par <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C-NMR et spectrométrie de masse. La substance bioactive identifiée est la flavone-3,4',-7-trihydroxy-3'-methoxy-7-glucoside. Cette flavone est un inhibiteur compétitif puissant de la carboxylestérase hépatique porcine.
Etude des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de <i>P. scoparius</i> Benth. et Hook : « Guezzah » : plante médicinale endémique du Sahara (Adida, 2015).	Les différentes parties de <i>P. scoparius</i> (tiges, fleurs et racines), provenant de la région de Béchar, sont utilisées. Différents solvants ont été utilisés (chloroforme, eau, méthanol 70% et acétone 70%). Deux méthodes d'extraction ont été utilisées : la macération et l'extraction sous reflux. L'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH• et la réduction de fer) a montré une activité antioxydante intéressante pour les extraits étudiés. L'évaluation des activités antibactérienne et antifongique à l'égard d'un nombre de microorganismes a permis de constater que les extraits hydrométhanoliques et hydroacétoniques ont une meilleure action sur ces microorganismes.
Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien (Hammoudi, 2015).	Les parties aériennes de <i>P. scoparius</i> (récoltée dans la région du Hoggar centre, Tamanrasset), ont été utilisées. Deux types d'extractions ont été effectués : extraction assistée par ultrasons et macération. Plusieurs solvants ont été utilisés et des optimisations des paramètres d'extraction ont été réalisées de suite. Les extraits ont montré une activité antioxydante intéressante. Ils ont également montré des activités antibactérienne et antifongique vis-à-vis d'un panel de microorganismes (bactéries à Gram positif, à Gram négatif et une levure).
High <i>in vitro</i> antiurolithiatic effect of <i>P. scoparius</i> roots extracts (Benalia <i>et al.</i> , 2016).	Les parties aériennes ainsi que les racines de <i>P. scoparius</i> (récoltée dans l'Atlas saharien algérien) ont été sujettes à des extractions par décoction avec plusieurs solvants. Les extraits ont montré une richesse en tannins catéchiques. Les extraits méthanoliques peuvent présenter une bonne piste pour l'efficacité de traitement de la formation de calculs rénaux.
Assessment of antioxidant potential and phytochemical analysis of <i>P. scoparius</i> crude extract and its fractions (Belyaboubi-Benhammou, 2017)	Les parties aériennes de la plante, récoltée dans la localité d'El-Kantra (Nord de la région de Biskra). L'extrait brut hydroalcoolique (méthanol 70%) et de ses fractions (n-Hexane, l'étherdiéthylique, chloroforme, acétate d'éthyle, et n-butanol) ont montré la présence de polyphénols et une activité antioxydante dépendante de la nature de l'extrait étudié.

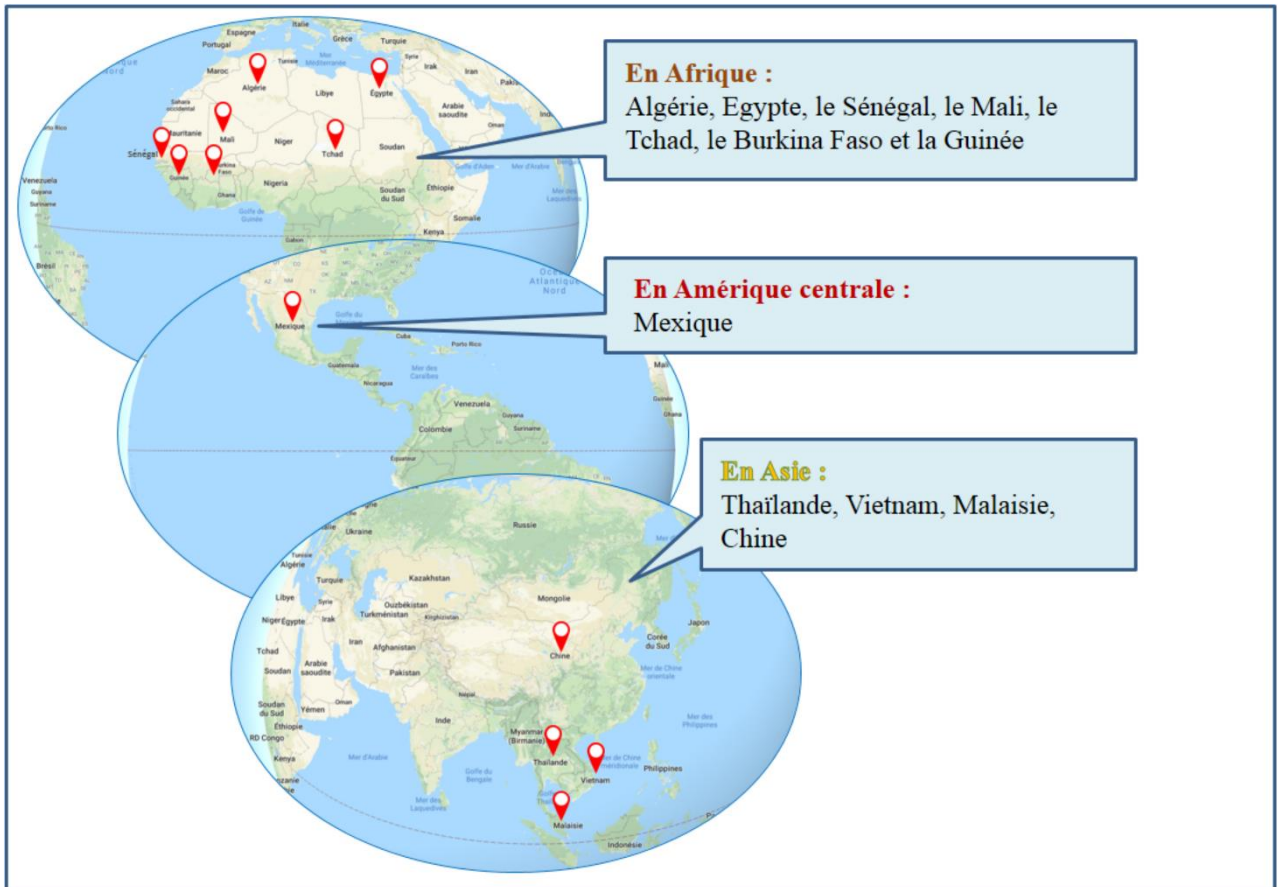


**Figure 19** : photographies de l'Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.). (A) feuille, (B) fleur, (C) fruit (capsule), (D) calices, (E) graines et (F) partie aérienne (tige, feuille et calices) (Endrias, 2006 ; Cissé et al, 2009).

## **7.2. Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*)**

L'Hibiscus (Figure 19) appartient à la famille Malvaceae et était cultivée à l'origine en Afrique centrale et de l'ouest. Par la suite, elle a été largement disséminée pour la culture dans les zones tropicales et sud-tropicales, le sud-est de l'Asie et les Indes orientales, en Amérique centrale et au Mexique. Elle se rencontre également en Egypte, Sénégal, Tanzanie, Mali, Tchad et la Jamaïque (Ali *et al.*, 2005 ; Endrias, 2006, Tangara, 2012).

*Hibiscus sabdariffa* L. également connue sous le nom de Roselle (Tableau 2A), est une plante idéale pour les pays en voie de développement car est relativement facile à cultiver, peut croître comme partie de systèmes à multicultures, servir d'aliment source de fibres et possédant diverses potentialités biologiques (Tableau 2B). En Chine, les graines sont utilisées pour leur contenu en huile végétale alors que le reste de la plante est exploité (Figure 19F) pour ses propriétés médicinales. En Afrique de l'ouest, les feuilles (Figure 19A) et les graines (Figure 19E) réduites en poudre sont utilisées dans les préparations culinaires. En outre, elle est utilisée dans les industries pharmaceutiques et agroalimentaires (Da Costa Rocha *et al.*, 2014). Les calices (Figure 19D) épais, rouges et charnus de la fleur (Figure 19B) dont la forme rappelle celle d'une tasse sont consommés et utilisés dans l'alimentation humaine, soit sous forme de confitures et gelées, soit sous forme de boissons chaude (thé) ou froide rafraichissante (jus) (acidulées ou pas selon les variétés). La couleur rouge attractive en est caractéristique et relative à la richesse de la plante en pigments anthocyanes, permettant ainsi d'exploiter la plante comme source de pigments naturels (agents colorants naturels) au profit des industries agro-alimentaires et le secteur pharmaco-cosmétique (Ali *et al.*, 2005 ; Cissé, 2010). La boisson est produite à partir d'un extrait obtenu par extraction en phase aqueuse (25 à 100 °C). Après filtration, du sucre ainsi que d'autres ingrédients (jus d'autres fruits, des morceaux de fruits et des aromatisants) peuvent être ajoutés. La consommation de cette boisson est très répandue en Afrique et en Asie. Très populaire au Sénégal, sa consommation est d'autant plus importante durant le mois sacré de Ramadhan. Au Mali, Côte d'Ivoire et Burkina Faso cette boisson est nommée « da Bilenni ». En Egypte, elle est célèbre comme « boisson des Pharaons » et au Soudan « thé Karkadé ». Elle est consommée chaude ou froide en fonction de la saison (Cissé, 2009). Dans la transformation alimentaire des calices de l'Hibiscus en jus, les graines sont éliminées et sont considérées comme un sous-produit du process. Récemment, les chercheurs ont bien démontré leur intérêt nutritionnel poussant l'industrie agroalimentaire à se focaliser sur l'utilisation effective de ces graines, non pas comme sous-produits de la transformation des calices mais comme source alimentaire (Nyam *et al.*, 2012).



**Figure 20 :** distribution géographique de l’Hibiscus dans le monde.

**Tableau 2A** : aperçu général des caractéristiques botaniques, géographiques et thérapeutiques de l’Hibiscus (*H. sabdariffa*) (Endrias, 2006 ; Cissé, 2010 ; Tangara, 2012).

Caractéristiques et propriétés	Hibiscus
<b>Noms scientifiques</b>	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.
<b>Noms vernaculaires</b>	Oseille de Guinée, thé rose d’Abyssinie (français), Roselle (anglais), Karkadé (arabe), Bissap, Bondo, Dakumu, Kutia, foléré, Guniéa Sorrel (jargons africains), Flora de Jamaïque (mexicain), Kra-chiap (thaïlandais) et Rosellahanf (allemand)
<b>Classification botanique</b>	Règne : Végétal ; embranchement : Spermaphytes ; sous-embranchement : Angiospermes ; classe : Dicotylédones ; ordre : Malvale ; famille : Malvacées ; genre : <i>Hibiscus</i> , espèce : <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.
<b>Description botanique</b>	<i>H. sabdariffa</i> est une plante herbacée et annuelle qui peut atteindre 1 à 2 m de haut, suivant le type de l’espèce et le mode de culture. Les feuilles sont ovales, alternées, trilobées ou simples sur des tiges fleuries. La tige est robuste, verte ou rouge, selon les variétés. Les fleurs sont réparties le long de la tige, les fleurs ont de 7 à 10 cm de diamètre, roses à la périphérie, puis devenant jaunes à l’intérieur pour finir avec un cœur pourpre bordeaux. Le fruit rond dans lequel il y a quelques graines est entouré par le calice persistant. Les graines sont ovoïdes de teinte brune.
<b>Distribution géographique et écologie de la plante</b>	Cultivée largement dans les régions tropicales et subtropicales des deux hémisphères du globe (Figure 20). La récolte se fait de juin à septembre pour les feuilles, octobre pour les calices et fin octobre-début novembre pour les graines.
<b>Composés rencontrés dans la plante</b>	Les calices contiennent des protéines, des sucres (glucose, fructose et saccharose), des pectines, des fibres, des minéraux, du carotène, acides organiques (acides succinique, oxalique, tartrique et malique) des polyphénols (anthocyanines). Les graines contiennent surtout une huile végétale riche en acides gras linoléique, oléique, palmitique, stéarique et arachidonique, mais aussi en tocophérols (formes $\alpha$ , $\gamma$ et $\delta$ ). Elles contiennent également des protéines et des acides aminés (acides glutamique, aspartique, leucine et arginine). Les feuilles contiennent des protéines sont riches en oligoéléments (fer, calcium, magnésium et zinc).
<b>Usage en médecine traditionnelle</b>	Les infusions des calices (thé d’ <i>H. sabdariffa</i> ) sont utilisées pour le traitement de l’hypertension. Les calices en décoction sont utilisés comme diurétiques et antiseptiques urinaires.
<b>Pharmacologie et toxicité</b>	Effets antihypertensif, cardio-protecteur, anti-athérosclérotique, anti-leucémique ( <i>in vitro</i> ), antioxydants ( <i>in vivo</i> ) et antalgiques des extraits d’ <i>H. sabdariffa</i> . Effet antioxydant des macéras de calices similaire à celui de l’acide ascorbique. Inhibition de l’oxydation des LDL, prévention de l’hyperlipidémie, réduction de l’hépatotoxicité. Les études ont montré une absence de toxicité dans les poudres des calices, absence de toxicité aigüe dans le décocté aqueux et absence de toxicité subaiguë dans l’extrait hydroalcoolique des calices desséchés.

**Tableau 2B :** synthèse de quelques travaux traitants diverses potentialités biologiques des différentes parties de la plante *H. sabdariffa* L.

Intitulé de la publication	Résultats obtenus
The fatty acid composition of <i>Hibiscus sabdariffa</i> seed oil (Ahmed et Hudson, 1982)	L'analyse de l'huile végétale des graines de <i>H. sabdariffa</i> de différents cultivars et régions de culture, a montré des différences au niveau du profil en acides gras notamment pour l'acide gras linoléique (30,1-37,45%), l'acide expoyoléique (de l'état de trace à 5,3%) et l'acide dihydrosterculique (1,0-1,6%). Les acides gras myristique (0,2-0,5%), palmitique (17,4-22,6%), stéarique (3,9-7,2%) et oléique (34,6-39,8)% sont parmi les autres acides gras caractérisés.
Structure and contents of main coloring constituents in the calyces of <i>H. sabdariffa</i> and commercial Roselle color (Sato <i>et al.</i> , 1991)	Le principal colorant des calices secs de <i>H. sabdariffa</i> est le delphinidin-sambubioside dont la structure chimique (3-[ <i>o</i> - $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside] a été élucidée par des méthodes spectroscopiques (COSY NMR et NOESY NMR). Les teneurs en ce composé dans l'extrait aqueux et le pigment commercial d'Hibiscus (analyse quantitative par HPLC) sont de 1,1 et 0,3% respectivement. Du fait que ce composé représente clairement la couleur de l'extrait aqueux, il peut être utilisé comme composé de référence pour la standardisation des pigments d'Hibiscus commerciaux.
Protective effects of dried flower extracts of <i>H. sabdariffa</i> L. against the oxidative stress in rat primary hepatocytes (Tseng <i>et al.</i> , 1997).	Trois fractions d'extrait brut éthanolique (fractions solubles de chloroforme, acétate d'éthyle et fraction résiduelle) ont été obtenues après extraction des fleurs séchées pendant deux semaines à température ambiante. L'activité antioxydante a été évaluée par le test au DPPH* (EC <sub>50</sub> =17 $\mu$ g/mL) et l'inhibition de la xanthine oxydase (EC <sub>50</sub> =742 $\mu$ g/mL). L'étude de la bioactivité de ces extraits bruts a été réalisée en utilisant le modèle du tert-butyl hydroperoxyde ( <i>t</i> -BHP) induisant des dommages oxydatifs dans les hépatocytes primaires du rat. Les résultats obtenus montrent que les fractions solubles de chloroforme et d'acétate d'éthyle induisent une protection des hépatocytes du rat de la cytotoxicité et génotoxicité par différents mécanismes.
Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) extract (Tsai <i>et al.</i> , 2002).	Une décoction des calices séchés d' <i>H. sabdariffa</i> pour l'étude de la relation entre la couleur des anthocyanines et la capacité antioxydante par les différents tests de l'activité antioxydante (FRAP, ORAC et TAS). Les résultats ont montré que les anthocyanines sont les principaux contributeurs à la capacité antioxydante de l'extrait d'Hibiscus. Cet effet antioxydant dépend de la biodisponibilité des anthocyanines. Des études ont montré que le delpinidium-3-sambubioside et la cyanidin-3-sambubioside sont rapidement absorbés du tractus gastro-intestinal quand ils sont administrés dans l'alimentation aux rats.
Inhibitory effects of <i>H. sabdariffa</i> L. extract on low-density lipoprotein oxidation and anti-hyperlipidemia in fructose-fed and cholesterol-fed rats (Chen <i>et al.</i> , 2004).	Un décocté des fleurs d'Hibiscus, utilisé comme boisson locale et médicinale à Taiwan, est employé pour son activité antioxydante contre l'oxydation des LDL par examen des mobilités électrophorétiques relatives et du test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Les résultats ont montré que le décocté étudié peut être utilisé afin d'inhiber l'oxydation des LDL et prévenir différents types d'hyperlipidémie.
Comparative study of anthocyanin and volatile compounds content of four varieties of Mexican Roselle ( <i>H. sabdariffa</i> L.) by multivariate analysis (Camélo-Mendez <i>et al.</i> , 2013).	Cette étude a permis la comparaison la teneur en anthocyanines totaux et les composés volatiles dans les extraits aqueux et éthanoliques de 4 variétés d'Hibiscus au Mexique, avec différents niveaux de pigmentation. L'analyse multivariée a montré que l'éthanol est le meilleur solvant d'extraction des anthocyanines et des composés volatiles. La concentration des anthocyanines dans les variétés pigmentées est comprise entre 17,3-32,2 mg cyanidine-3-glucoside/ g de poids sec et que le géraniol est le composé majoritaire dans les 4 variétés étudiées.





## **1. Contexte national et international de la thèse**

Le recours aux antioxydants naturels (polyphénols et huiles essentielles) est une option qui devient de plus en plus récurrente. Les travaux de recherche dans ce sens ont étayé la thématique et ont fait passer au peigne fin les molécules bioactives pouvant présenter un intérêt industriel avéré, surtout par rapport à leur activité antioxydante. L'industrie agroalimentaire, à l'instar de l'industrie pharmaceutique, est en quête perpétuelle de molécules pouvant avoir des effets bénéfiques dans l'aliment élaboré. Ces effets peuvent avoir des impacts positifs et confèrent une meilleure qualité (au sens large de ce terme) au produit. Bien que la littérature scientifique regorge de travaux traitant des effets bénéfiques des molécules bioactives, les études épidémiologiques n'ont pu démontrer, à ce jour, la contribution directe et effective de ces antioxydants dans les processus physiologiques. La majorité des études sont réalisées plus *in vitro* qu'*in vivo* et l'extrapolation à des sujets humains se heurte à plusieurs contraintes (éthiques et matérielles). Hormis le concept du paradoxe français (cité également dans la section revue bibliographique) et la constatation que les populations de la méditerranée ont des espérances de vie plus importantes et sont moins exposées aux risques liés aux maladies cardiovasculaires (régime alimentaire riche en antioxydants naturels), il est difficile de relier l'effet direct d'un composé (ou d'un groupe de composés) présent dans un aliment avec une maladie bien précise. En outre, les études éparses réalisées sur des matrices alimentaires simples ont montré la difficulté d'extrapoler par rapport à des matrices alimentaires plus complexes en ce qui concerne l'effet antioxydant ou prooxydant d'une substance d'intérêt (référé dans la revue bibliographique comme le paradoxe polaire). En Algérie, les unités d'extractions des huiles essentielles se comptent sur les bouts des doigts et sont généralement soit des entreprises familiales (où le personnel a un savoir-faire limité) ou des petites moyennes entreprises (PME) ouvertes dans le cadre de l'aide aux jeunes et nouveaux diplômés. Leur production reste limitée et ne couvre pas les besoins du marché national, sachant que les huiles essentielles sont destinées soit pour le secteur agroalimentaire comme agents aromatisants (huiles essentielles des agrumes le plus souvent), soit pour le secteur des produits cosmétiques et pharmaceutiques selon les témoignages des gens du domaine.

Un des grands efforts de l'industrie agroalimentaire ces dernières décennies est l'utilisation et l'incorporation d'antioxydants naturels dans les produits alimentaires, pour un double objectif : garantir la qualité des produits commercialisés et satisfaire l'intérêt croissant des consommateurs pour des produits naturels et sains, au lieu de se rabattre sur des produits contenant des ingrédients de synthèse chimique. Dans le cas particulier des émulsions

alimentaires (beurre, margarine, mayonnaise, chocolat), l'incorporation des agents antioxydants est indispensable afin de contrecarrer les phénomènes d'oxydation des lipides, pouvant réduire de manière drastique la qualité commerciale de ces produits. Cependant, les antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) ont donné place à des antioxydants d'origine naturelle comme le  $\beta$ -carotène et l' $\alpha$ -tocophérol. Par ailleurs, la disponibilité et le prix des matières premières sources de ces molécules antioxydantes peuvent être compromis par les conditions climatiques et les fluctuations du marché. Les entreprises nationales en Algérie utilisent généralement des antioxydants issus de l'hémisynthèse comme l' $\alpha$ -tocophérol et le  $\beta$ -carotène (cas de l'entreprise CEVITAL SPA).

Le marché algérien a connu un essor très ressenti, surtout en termes de diversité des produits alimentaires. Les industries agroalimentaires ont contribué significativement à ceci, car des pôles agroalimentaires se sont installés un peu partout dans le pays. Ainsi, un nombre important d'industries agroalimentaires proposent de nouveaux produits et disposent (pour un bon nombre d'entre elles) de services qualité et recherches et développement qui assurent le maintien d'une production de plus en plus importante. Des initiatives encourageantes de la part des académiciens et des industriels ont permis d'aboutir à des collaborations, bien que timides mais prometteuses. Le consommateur algérien est devenu de plus en plus informé de la qualité des produits alimentaires qu'il consomme, et ce via des campagnes de sensibilisation dispensées par certains organismes de l'état (la direction du commerce, les services de répression des fraudes et le ministère de la santé). Cette sensibilisation se traduit soit par des affiches qu'on retrouve dans plusieurs institutions étatiques (écoles, hôpitaux) et dans les espaces publiques soit via les médias (télévision, presse écrite). Malheureusement, la notion de « qualité produit » en Algérie reste désuète. Le consommateur algérien, dans la plupart des cas, se préoccupe plus du prix que de la qualité du produit. Le rapport qualité/prix est loin d'être perçu comme composante essentielle dans le choix d'un produit par rapport à un autre, ce qui n'est pas le cas outre-mer par exemple.

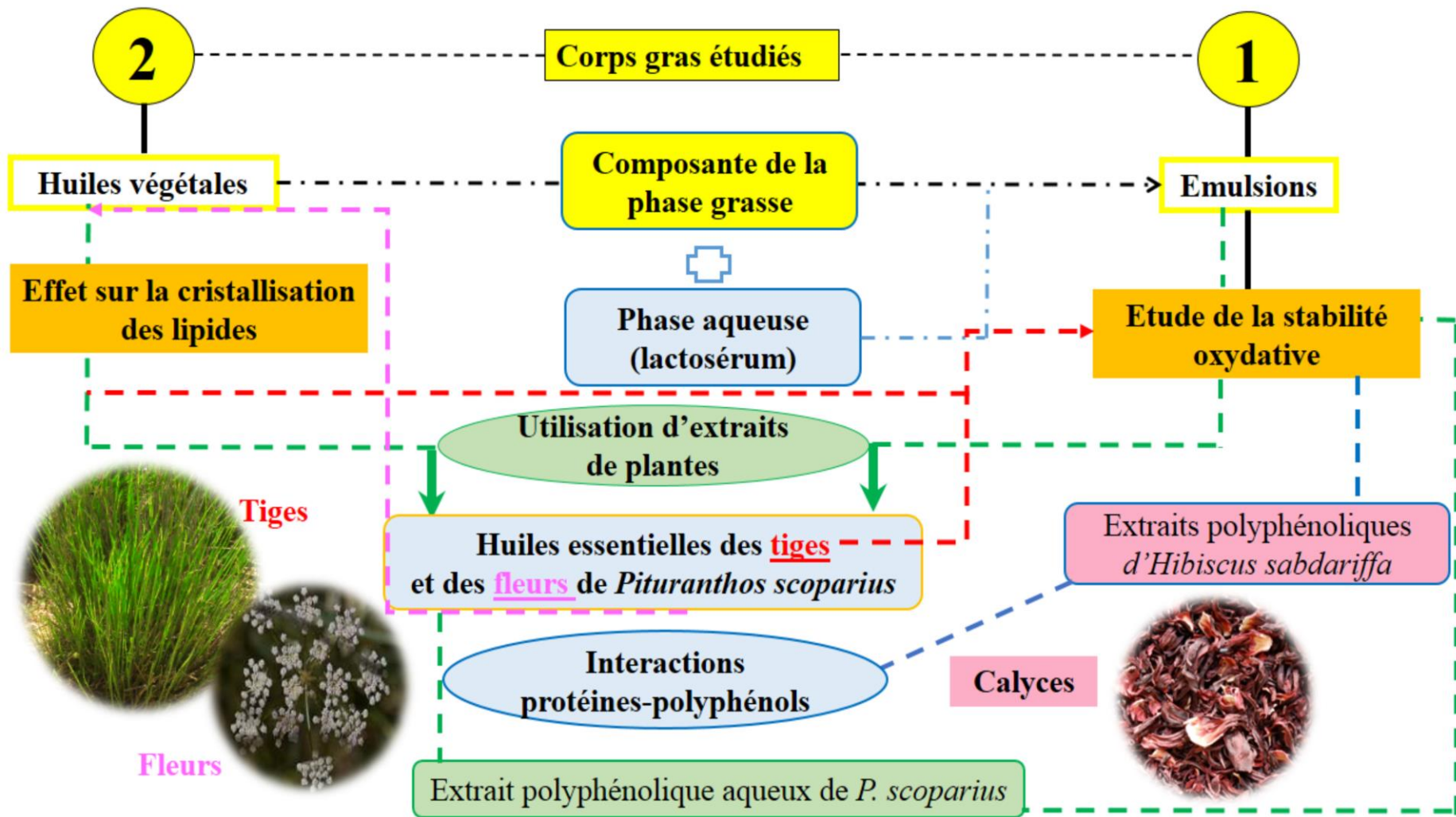
## **2. Formulation de la problématique et détermination des objectifs de la thèse**

Les corps gras sont largement consommés en Algérie sous diverses formes, soit sous forme de produits transformés (huiles végétales pour fritures, shortenings, beurres, margarines, mayonnaise), soit sous forme d'huiles végétales brutes telles que les huiles d'olive et de lentisque. Ces corps gras sont toutefois sujets le plus généralement aux phénomènes d'oxydation, dans le cas où les conditions de stockage sont de fortune ou lorsque des facteurs

internes ou externes (catalyseurs de l'oxydation) favorisent l'installation de ces phénomènes lors du stockage. Des antioxydants sont utilisés dans les industries des corps gras comme évoqués précédemment, mais sont exclusivement importés par les entreprises algériennes. Ces importations sont le plus souvent subordonnées aux fluctuations des marchés internationaux, constituant de ce fait une véritable contrainte pour nos entreprises nationales. De par la conjoncture actuelle, la tendance est orientée vers la limitation des importations et l'encouragement de la production locale sous toutes ses formes. Des initiatives ont été entreprises et des efforts ont été déployés par les petites et moyennes entreprises (PMEs) en Algérie, afin de revitaliser la dynamique de la production nationale surtout agricole. A titre d'exemple, l'association des figes sèches de Béni Maouche (Béni Maouche, Wilaya de Béjaïa) a été l'une des pionnières à avoir certifié et labélisé les figes de la région, ce qui lui a permis d'exporter ce produit vers les états membres de l'union européenne. D'autres PME de la région sont dans une dynamique similaire et sont en train d'appliquer ce modèle qui commence déjà à donner ses fruits.

Afin de proposer l'usage des antioxydants naturels extraits à partir de plantes comme antioxydants à utilisation intensive au niveau industriel, il est impératif de confirmer l'effet antioxydant de ces molécules dans une matrice alimentaire modèle : une émulsion type matière grasse tartinables (spread en anglais). En outre, la caractérisation fine de ces molécules est un passage obligatoire pour la compréhension de la contribution d'un ou d'un mélange de composés dans l'activité antioxydante. Dès lors qu'on parle de matrice alimentaire, il est évident que des interactions entre les composés additionnés et certains composés de la matrice prennent place. L'effet de ces interactions sur la stabilité oxydative de l'émulsion étudiée constitue un paramètre crucial pour la compréhension du devenir des molécules bioactives incorporées ainsi que leur efficacité dans la protection contre l'oxydation. Eventuellement, la présence de ces molécules dans un milieu, où deux phases coexistent dans un équilibre thermodynamique stable assuré par un émulsifiant, n'est-il pas en mesure de provoquer un changement dans la microstructure du produit ? Est-il possible que leur présence soit à l'origine d'une modification de la composition moléculaire ?

Afin de répondre à ces questions et de démontrer l'hypothèse d'après laquelle les antioxydants vont assurer une protection de la matrice lipidique, une panoplie de techniques (spectrophotométriques, chromatographiques, spectroscopique, thermiques et optiques) sont nécessaires pour caractériser ces molécules bioactives. Le recours à ces techniques, pour certaines de pointe, nécessite une coopération et collaboration avec des institutions étrangères



**Figure 21** : schéma global des différents volets traités et aspects étudiés dans la présente thèse.

ayant une expertise avérée dans le domaine. C'est notamment par le biais du financement de l'institut de Nutrition, Alimentation et Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1 (UFMC1) que les résultats de la présente thèse de doctorat ont pu voir le jour. Deux institutions internationales et une entreprise agroalimentaire nationale ont contribué et collaboré activement à la réalisation de ce travail de thèse de doctorat, avec l'implication intégrale de l'INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1 :

- ♣ Equipe MAQUAV (Muscle et Qualité de la Viande), Laboratoire BIOQUAL (Biotechnologies et Qualité des Aliments), INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1 ;
- ♣ Laboratoire de Biochimie Alimentaire (L06), Institut National de Chimie, Ljubljana, Slovénie ;
- ♣ Laboratoire de Corps Gras, Département de Nutrition, Diététiques et Sciences Alimentaires, Université d'Etat de l'Utah, Logan, Utah, Etats-Unis d'Amérique ;
- ♣ Département de recherches et développement et service de contrôle qualité (laboratoire margarinerie), entreprise agroalimentaire CEVITAL SPA, Béjaia, Algérie

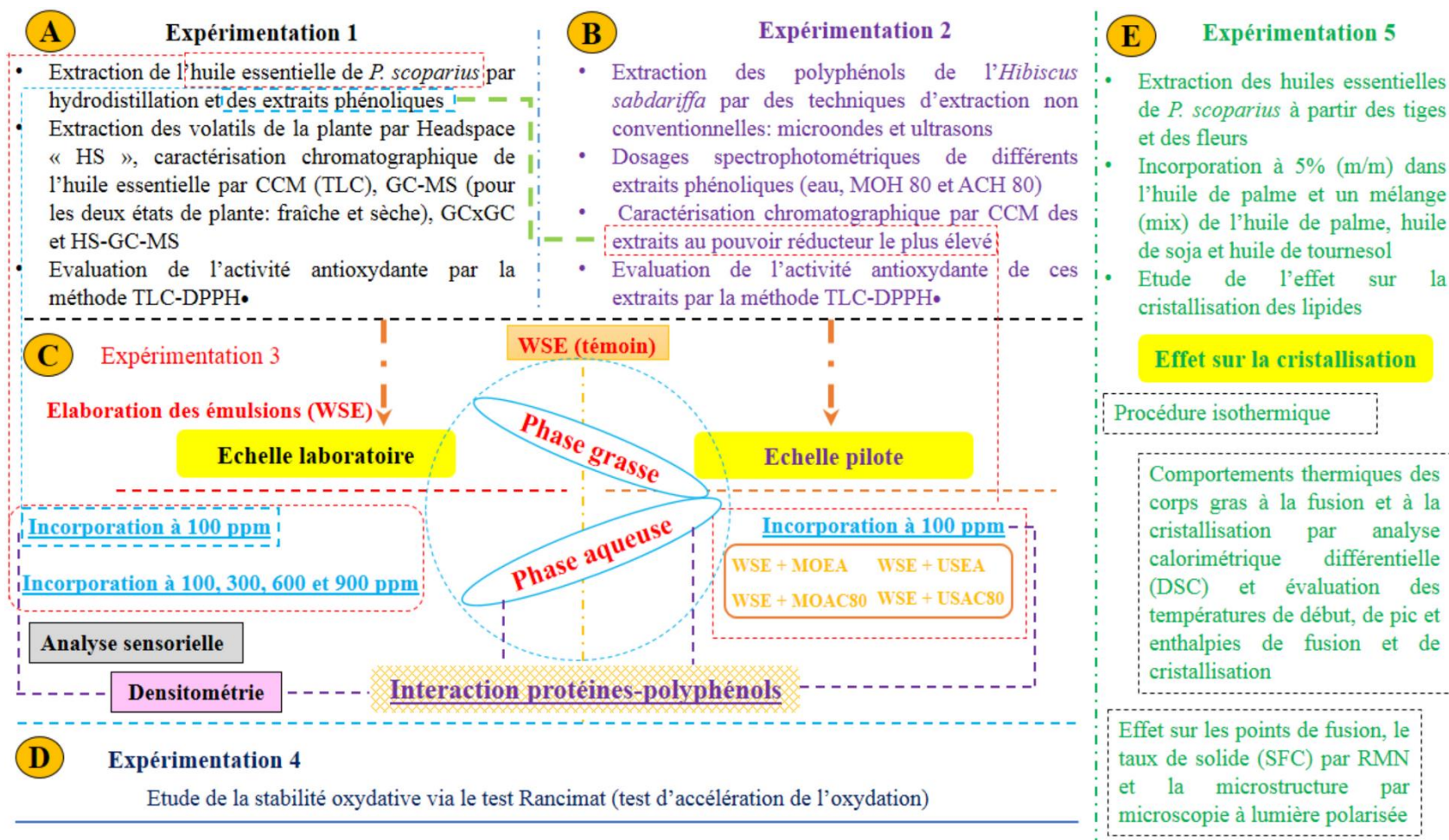
Les objectifs du présent travail de thèse se dessinent à travers une stratégie d'investigation des molécules bioactives à propriétés antioxydantes, susceptibles d'induire de façon permanente une stabilité oxydative d'une émulsion modèle, mais aussi leur effet dans l'organisation cristalline d'une des composantes majoritaires de cette dernière: la phase grasse (les triglycérides comme étant les composés cristallisables de cette phase). Trois volets principaux sont abordés de façon exhaustive (Figure 21), eux-mêmes subdivisés en plusieurs objectifs sous-jacents:

*i.* Relier la composition terpénique de l'huile essentielle d'une plante endémique de l'Afrique du nord (*Pituranthos scoparius*) à son pouvoir antioxydant et son aptitude à induire une protection contre l'oxydation du système d'émulsion modèle. La démarche consiste à : 1) Extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle à partir des tiges de *P. scoparius*, 2) Caractérisation chromatographique de l'huile essentielle de *P. scoparius*, 3) Mise en évidence de son pouvoir antioxydant, 4) Incorporation de l'huile essentielle à différentes concentrations (100 ppm, 300 ppm, 600 ppm et 900 ppm) dans une émulsion type matière grasse tartinable, élaborée à l'échelle laboratoire et testée pour sa stabilité oxydative à ces différentes concentrations, 5) Réalisation d'une analyse sensorielle via un test hédonique, nous permettant de se renseigner sur l'appréciation de sujets naïfs quant l'addition de cette huile essentielle à

différentes concentrations. Dans ce cas, un outil statistique (ACP : analyse en composantes principales) et une représentation graphique (biplot) sont utilisés pour déterminer l'influence de la concentration sur la détection de l'arôme de cette huile essentielle par le dégustateur ;

*ii.* Mise en évidence des interactions pouvant avoir lieu entre les polyphénols issus des extraits polyphénoliques d'une plante potentiellement riche en anthocyanines (*Hibiscus sabdariffa*), avec les protéines de la phase aqueuse d'une émulsion modèle. La stratégie adoptée se déploie dans les points suivants : 1) Extraction des polyphénols localisés dans les calices de l'Hibiscus par deux méthodes non conventionnelles : les microondes et les ultrasons, 2) Caractérisation chromatographique des extraits polyphénoliques et mise en évidence de leur activité antioxydante, 3) Incorporation des extraits polyphénoliques montrant le meilleur pouvoir antioxydant dans une émulsion (type matière grasse tartifiable), élaborée à l'échelle laboratoire à une concentration fixée à 100 ppm (concentration employée par l'entreprise), 4) Etude des interactions possibles entre ces polyphénols et les protéines via la technique d'électrophorèse et identification des protéines/peptides impliqués dans les interactions par LC/MS-MS. L'impact de ces interactions sur la stabilité oxydative de l'émulsion est étudié. La compréhension de la distribution des polyphénols incorporés dans une matrice de lipides, leur interaction avec les composants du milieu et la préservation de leur activité antioxydante revêt un intérêt technologique majeur en formulation alimentaire ;

*iii.* Etude de l'effet des terpénoïdes constituant l'huile essentielle de *P. scoparius* sur la microstructure de la phase majoritaire de l'émulsion étudiée (phase grasse). Ceci constitue une approche fondamentale de la dynamique des terpènes, dans un environnement caractérisé par une organisation moléculaire cristalline inféodée à la présence de triglycérides (TAGs) pouvant cristalliser sous différentes formes. Cet aspect inédit a été soigneusement étudié par une approche fondamentale basée sur des caractéristiques thermiques, spectroscopiques et microscopiques des lipides cristallins. Deux pistes d'investigations sont menées : la première est menée sur l'huile de palme seule, la seconde sur le mélange constituant la phase grasse de l'émulsion de départ (huile de palme, huile de soja et huile de tournesol).



**Figure 22 :** schéma de synthèse du design expérimental adopté dans le travail de thèse. WSE : émulsion à base de lactosérum type spread, CCM : chromatographie couche mince, TLC : thin layer chromatography, GC-MS : chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse, GCxGC : chromatographie gazeuse bidimensionnelle, HS-GC-MS : headspace- chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse, MOEA : extrait aqueux par microonde, MOAC80 : extrait acétonique par microonde, USEA : extrait aqueux par ultrasons, USAC80 : extrait acétonique par ultrasons.

Deux objectifs déclinent de cette étude : 1) Analyse chromatographique fine de la composition terpénique de l'huile essentielle extraite à partir des deux organes de la plante (les tiges et les fleurs), 2) Etude de l'effet de l'addition de ces deux huiles essentielles sur le comportement à la cristallisation des lipides de l'huile de palme et un mélange des huiles végétales (Mix) constitué des huiles de palme, huile de soja et huile de tournesol (afin de reproduire la composition de la phase grasses des émulsions élaborées à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote). L'intérêt primaire étant de comprendre l'effet de l'huile essentielle de *P. scoparius* en qualité d'additif sur la microstructure de ces huiles végétales. Cependant, l'intérêt ultime est d'orienter le technologue dans le domaine des corps gras sur la possibilité de modification de la cristallisation des lipides, en vue de l'obtention d'un produit d'une texture particulière à partir d'une microstructure modifiée.

### **3. Méthodologie générale de la thèse**

Le design expérimental de la thèse est présenté en Figure 22. Le matériel végétal utilisé dans le cadre de cette thèse est représenté par deux plantes : le Pituranthos à balai (*Pituranthos scoparius* ou *Deverra scoparia*) et l'Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*). La première a été exploitée pour ses huiles essentielles surtout (tiges et fleurs), tandis que la seconde a été choisie pour sa richesse notable en polyphénols (les anthocyanines). Deux raisons ont motivé leur utilisation :

i) La première a été choisie de par son utilisation par les populations locales pour la conservation et l'aromatisation de produits périssables tels que le fromage et la viande. Ce sont ses tiges qui sont le plus utilisées, en l'état, enveloppant ainsi ces produits de façon à assurer une protection contre la flore d'altération. C'est une plante qui défie les conditions climatiques des moins clémentes des régions semi arides. Elle jonche dans plusieurs cas les oueds de ces régions et son aspect rappelle celui de l'Alfa ;

ii) La seconde est employée de manière prépondérante dans plusieurs pays africains notamment le Burkina Faso, dont la gamme de produits s'étale de la confiture artisanale jusqu'au jus frais servis à volonté. Cette plante a vraisemblablement migré dans le Sud Algérien, au niveau de la région de Tamanrasset, via surtout les herboristes Touaregs qui se déplacent dans les pays limitrophes à la recherche des herbes aromatiques et médicinales. Sa richesse en anthocyanines, considérées comme étant des pigments alimentaires très convoités, nous a particulièrement interpellé pour son utilisation comme agent de conservation alimentaire.

Dans les trois volets étudiés, cinq grandes expérimentations sont identifiées sur la base de la chronologie suivie. Différents types d'extraction ont été réalisés pour récupérer les molécules



bioactives d'intérêt. Des techniques conventionnelles (hydrodistillation) et non conventionnelles (microondes et ultrasons) ont été adoptées pour extraire les huiles essentielles (Pituranthos à balai) (expérimentation 1 A) et les polyphénols (Hibiscus) (expérimentation 2 B). Il est à noter que dans le cas de l'huile essentielle de *P. scoparius*, l'extraction des volatiles a été effectuée par la méthode de l'espace-de-tête (headspace).

La conduite de ces techniques a permis l'obtention des huiles essentielles et des extraits phénoliques qui ont été caractérisés par chromatographie. L'usage de celle-ci est indispensable de nos jours dans l'investigation des molécules bioactives et des autres molécules dont il est question de caractériser. Dans le cadre de cette thèse, trois types de chromatographies sont utilisés : chromatographie planaire (chromatographie sur couche mince ou TLC), chromatographie liquide (chromatographie liquide haute pression) et chromatographie gazeuse. Ces techniques ont été appuyées par la spectrométrie de masse, outil performant pour l'identification des molécules cibles.

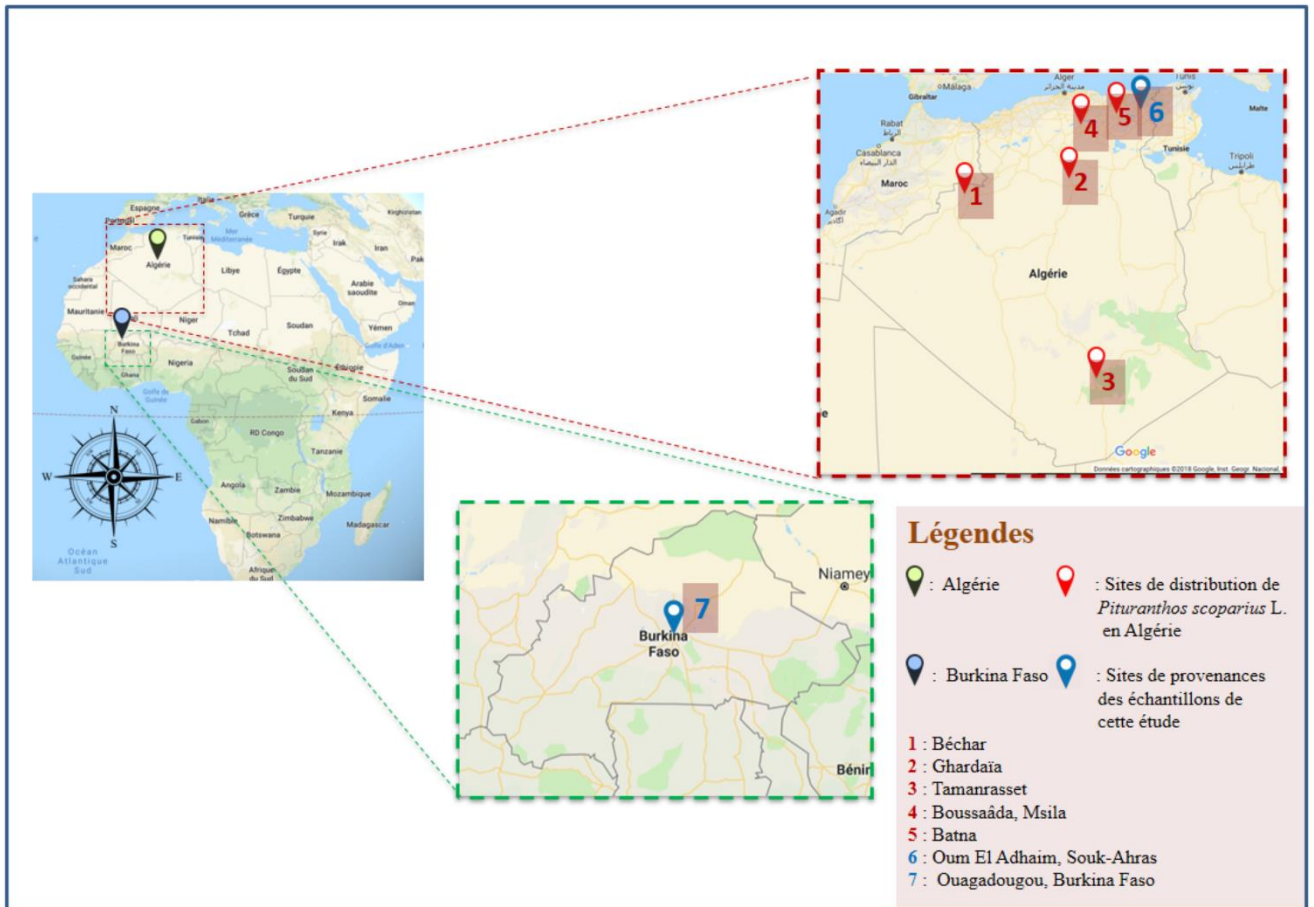
L'étude de l'effet de ces molécules bioactives s'est portée sur deux matrices modèles : des émulsions à base de lactosérum type graisses tartinables (expérimentation 3 C) et des huiles végétales (huile de palme et un mélange de l'huile de palme, de soja et de tournesol). Il est question dans ce cas d'incorporer les molécules bioactives extraites dans ces matrices, à des concentrations fixées selon la matrice étudiée. Puisque dans le premier cas il s'agit de la combinaison de deux phases (grasses et aqueuses), nos investigations se sont orientées vers l'étude des interactions protéines-polyphénols pouvant avoir lieu dans la phase aqueuse. Ces interactions ne sont étudiées que par électrophorèse et restent à explorer ultérieurement.

Dans le cas des émulsions étudiées, l'effet des substances incorporées a été apprécié par l'étude de la stabilité oxydative (expérimentation 5 D) induite par leur présence. Le Rancimat a été appliqué pour se faire une idée sur le degré de protection des molécules incorporées, face à des conditions d'oxydation drastique dans un court temps (48 h).

L'effet sur la cristallisation sur triglycérides de l'huile de palme et du mélange des huiles végétales palme, soja et tournesol (qui composent la phase grasse des émulsions étudiées), induit par l'incorporation des huiles essentielles de *P. scoparius* (tiges et fleurs) a été étudié (expérimentation 5 E) afin de comprendre si leurs terpénoïdes peuvent agir comme modificateurs du processus de cristallisation des lipides ou non. A l'issue de cette étude, une hypothèse a été formulée dans le sens de la modification de la microstructure des lipides étudiés. Ceci a été notamment appuyé par les analyses thermique (calorimétrie différentielle à

balayage), spectroscopique (résonance magnétique nucléaire basse résolution à champs pulsée) et microscopique (microscopie à lumière polarisée).





**Figure 23 :** localisation géographique des sites d'échantillonnage de *P. scoparius* et *H. sabdariffa*.

## **1. Echantillonnage**

### **1.1. Pituranthos à balai (*Pituranthos scoparius*)**

Cette plante a été choisie sur la base de son utilisation par les populations locales pour la conservation et l'aromatisation de produits périssables tels que le fromage et la viande. Ses tiges sont les plus utilisées car elles permettent d'envelopper les produits de façon à assurer une protection contre la flore d'altération. Les décoctés préparés à base des tiges sont connus pour soigner les maux de tous genres en pharmacopée traditionnelle.

L'échantillonnage pour le Pituranthos à balai est aléatoire et s'est basé sur les recommandations et renseignements fournis par certains herboristes des régions de la collecte de la plante. L'identification botanique de la plante a été réalisée par Dr. BEKDOUCHE F. (Laboratoire d'Ecologie et Environnement, Université Abderrahmane Mira de Béjaia). La partie aérienne de cette dernière est particulièrement visée dans le présent travail de thèse et comprend les organes suivants : tiges, feuilles et fleurs. La partie souterraine (racines) est ainsi débarrassée de la plante. Sa collecte s'est effectuée dans deux wilayas du pays, comme montrée dans la cartographie (Figure 23) dans trois périodes : Avril 2013, dans la région d'Oum Laadayem Sedrata (Wilaya de Souk Ahras) pour les tiges, octobre 2015 pour les fleurs et Avril 2016 pour les tiges dans la Wilaya de M'Sila. Des quantités d'environ 5 kg ont été récupérées à chaque fois. Un séchage naturel (à l'air ambiant) a été entrepris au niveau du laboratoire juste après la collecte pour une durée de deux mois. La plante est coupée en petites brindilles et réduite en poudre.

### **1.2. Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*)**

Elle est prépondérante dans plusieurs pays africains notamment le Burkina Faso où son utilisation est orientée vers la confection des confitures artisanales et jus frais. Sa richesse en anthocyanines (pigments naturellement colorés) constitue le critère de choix de sa sélection pour la présente étude.

Les calices de l'Hibiscus ont été récupérés à partir d'un potager de Ouagadougou (Burkina Faso) (Figure 23) en octobre 2013. Les calices collectés *in situ* ont fait l'objet d'un décorticage manuel et d'un séchage naturel au soleil sur des claies pour une courte période (3-4 jours). Après leur conditionnement dans des sacs appropriés (à l'abri de la lumière et de l'humidité), ils sont acheminés en à Constantine (Algérie) et conservés à température ambiante jusqu'à analyse. L'identification botanique a été réalisée par Dr. BEKDOUCHE F. et un voucher a été

déposé à l'INATAA (Université Frères Mentouri Constantine 1) sous le code (#2016 *Hibiscus sabdariffa*-AC-001-INATAA-UFMC).

### **1.3. Extraction des huiles essentielles de *P. scoparius***

#### **1.3.1. Hydrodistillation**

L'extraction des huiles essentielles à partir des tiges a été réalisée dans un premier temps avant et après séchage, pour constater la différence ou non dans le profil terpénique final. Dans un second temps, les tiges et les fleurs ne sont utilisées pour extraction de leurs huiles essentielles (EsO) qu'après séchage respectif. L'extraction des EsO a été réalisée par hydrodistillation, à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. Des masses de 150 g de la plante coupée en morceaux (tiges) et de poudre (fleurs) sont introduites dans un ballon de 2 L (en verre pyrex), avec un volume de 1,2 L d'eau distillée. Il est préconisé de laisser un volume vide correspondant à 1/3 du volume total du ballon. Les deux composantes dans le ballon (matière végétale + eau distillée) sont mélangées de manière à assurer une immersion totale de l'une dans l'autre, afin de favoriser les transferts de matière et de chaleur entre elles. Le mélange est ensuite porté à ébullition et les vapeurs issues du ballon se condensent dans un réfrigérant. Les gouttelettes d'eau chargées en EsO tombent dans le collecteur et l'huile se sépare de l'hydrolat (eau contenant des traces de l'EsO) sous l'effet de la différence de densité. L'EsO est ainsi obtenue après une durée d'extraction allant de 4 à 5 h.

#### **1.3.2. Calcul du rendement d'extraction en huiles essentielles**

Le rendement en EsO est le rapport entre la masse de l'huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale sèche (ou fraîche) utilisée. Le rendement est calculé après chaque extraction faite. Il est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$\mathbf{R\ (\%)\ =\ (m_1/m_2)*100}$$

Où :

**R (%)** : rendement de l'huile essentielle en pourcentage (m/m) ;

**m<sub>1</sub>**: masse de l'huile essentielle extraite en g ;

**m<sub>2</sub>**: masse du matériel végétal (coupés en morceaux ou en poudre) de départ en g.

Le calcul du rendement en huiles essentielles est exprimé en moyenne ± écart-type standard.

## **1.4. Extraction des composés phénoliques à partir des deux plantes étudiées**

### **1.4.1. Préparations des extraits aqueux bruts des polyphénols de *P. scoparius***

La plante a été coupée en petits morceaux dans un premier temps (petites brindilles de la plante), en utilisant des ciseaux de couture. Dans un second temps, une tentative de broyage de la plante a été effectuée. La nature fibreuse de celle-ci rend son broyage très délicat à effectuer. Ainsi, après plusieurs tentatives de broyage, l'usage d'un moulin à café en bois traditionnel (Alexanderwerk, Germany) était la meilleure option à retenir vu que le broyage a donné lieu à une poudre relativement fine de la plante. Les petites brindilles sont alimentées au fur et à mesure dans le moulin pour assurer un meilleur broyage.

L'extraction par décoction de la plante sous ses deux formes (coupée en petits morceaux et en poudre) en phase aqueuse est guidée par son usage traditionnel par les populations locales (décoctions pour divers usages). Les décoctés sont préparés avec les deux formes de la plante par extraction de 5 et 10 g de ces dernières dans 100 mL d'eau distillée (5 et 10%, m/v respectivement) pendant 30 min. Les extraits aqueux bruts obtenus ont été filtrés sur du papier filtre Whatman, puis centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Les surnageants ont été récupérés et conservés à 4 °C jusqu'à analyse.

### **1.4.2. Préparation des extraits bruts polyphénoliques de *H. sabdariffa***

Les extraits bruts ont été préparés en utilisant trois types de solvants : eau, méthanol dans l'eau (80%, v/v) et acétone dans l'eau (80%, v/v). Le choix des solvants utilisés est surtout dicté par la différence de polarité et les avantages de leur combinaison avec l'eau rapportés par la littérature scientifique. Deux techniques d'extraction non conventionnelles ont été employées : extraction assistée par microondes (EAM) et extraction assistée par ultrasons (EAU).

#### **1.4.2.1. Extraction assistée par microondes (EAM)**

L'extraction a été réalisée selon un protocole optimisé par Dahmoune *et al.* (2013), avec modification de la masse de la plante utilisée et du volume de solvant d'extraction. Une masse de 3g de poudre est mélangée avec 60 mL de solvant d'extraction (eau, méthanol à 80% et acétone à 80%), pour ainsi former une suspension dans un ballon. Ce dernier est placé soigneusement dans un four microondes domestique (NN-S674MF, Samsung, Malaisie), dont les dimensions de la cavité sont de 22,5 cm x 37,5 cm x 38,6 cm et opérant à une fréquence de travail de 2,45 kHz. Le four a été modifié de manière à condenser dans l'échantillon les vapeurs

générées lors de l'extraction et maintenir ainsi un volume d'échantillon constant. Le ballon est irradié pendant 120 s à 400 Watts. A la fin de l'irradiation, il est porté à refroidissement dans un bac à glace. L'extrait est récupéré par filtration (papier Whatman n°4), tandis que la poudre retenue par le filtre est réutilisée par épuisement une deuxième fois dans un volume de 40 mL de solvant, puis une troisième fois dans 20 mL de solvant pour un volume final d'extraction de 120 mL. Les filtrats combinés sont ensuite centrifugés à 3500 rpm pendant 10 min. Le surnageant obtenu est récupéré dans un flacon ambré et conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

#### **1.4.2.2. Extraction assistée par ultrasons (EAU)**

L'extraction a été réalisée selon un protocole optimisé par Dahmoune *et al.* (2013) avec la même modification que précédemment. Une quantité de 3g de poudre est mélangée avec 120 mL de solvant d'extraction (eau, méthanol à 80% et acétone à 80%) dans un bécher placé dans un bac d'eau froide et le tout placé dans un sonicateur (cellulaire SONICS Vibra, VCX 130 PB) opérant à une fréquence de travail fixée à 20 kHz. L'ensemble est ensuite exposé à des ondes acoustiques pendant 15 min à une amplitude de 50%. La température est contrôlée en continu à l'aide d'une sonde plongée dans le bécher. Elle est maintenue basse grâce à l'eau froide du bac. L'extrait est filtré (papier Whatman n°4), puis centrifugé à 3500 rpm pendant 10 min. Le surnageant est recueilli dans un flacon ambré et conservé à 4 °C jusqu'à utilisation.

### **1.5. Dosage des polyphénols des extraits de plantes étudiées**

#### **1.5.1. Dosage des polyphénols totaux**

La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée selon la méthode de Gulcin *et al.* (2002) avec modifications des volumes utilisés. Un volume de 200 µL de chaque extrait est mélangé avec 1 mL du réactif Folin-Ciocalteu dilué (1/10). Après trois minutes, 800 µL de carbonates de sodium (7,5%) lui sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 765 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (50 SpectroScan, UK).

La teneur en composés phénoliques totaux a été exprimée en équivalents gramme d'acide gallique (EAG) par 100 g de poids sec, en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour chaque solvant utilisé (eau :  $A = 9,407 C$ ,  $R^2 = 0,999$  ; méthanol 80% :  $A = 9,374 C$ ,  $R^2 = 0,998$  ; acétone 80% :  $A = 5,850 C$ ,  $R^2 = 0,998$ ), avec : A (absorbance des extraits) et C (concentration en polyphénols totaux dans les extraits).



### 1.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode de Djeridane *et al.* (2006), avec modifications des volumes utilisés. Un volume de 1 mL de chlorures d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 2% est additionné à 1 mL de chaque extrait. Après 15 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 430 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (50 SpectroScan, UK).

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine (pour chaque solvant utilisé) et exprimée en équivalents gramme de quercétine (EQ) par 100 g de poids sec (eau : A = 8,958 C, R<sup>2</sup> = 0,998 ; méthanol 80% : A = 19,707 C, R<sup>2</sup> = 0,984 ; acétone 80% : A = 31,814 C, R<sup>2</sup> = 0,998).

### 1.5.3. Estimation du pouvoir réducteur

L'évaluation de l'activité antioxydante a été effectuée par le pouvoir réducteur selon la méthode décrite par Oyaizu (1986). Un volume de 250 µL de chaque extrait est additionné du même volume de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et de ferricyanure de potassium (1 %). Après incubation à 50 °C pendant 20 min, 250 µL d'acide trichloracétique (10 %), 1 mL d'eau distillée et 200 µL de chlorure ferrique (0,1 %) sont ajoutés au mélange. Après 15min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 700 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (50 SpectroScan, UK). Le pouvoir réducteur est estimé en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique et exprimé en équivalents gramme d'acide ascorbique (EAA) par 100 g de poids sec (eau : A = 10,970 C, R<sup>2</sup> = 0,994 ; méthanol 80% : A = 68,653 C, R<sup>2</sup> = 0,997 ; acétone 80% : A = 31,193 C, R<sup>2</sup> = 0,999).

### 1.5.4. Dosage des anthocyanines dans les extraits d' *H. sabdariffa*

Un volume de 1 mL de chaque extrait a été ajouté à 2,4 mL de solution tampon. L'absorbance de l'extrait a été mesurée à 510 nm puis à 700 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (50 SpectroScan, UK) puis déduite par l'équation :

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH 1} - (A_{510} - A_{700})_{pH 4,5}$$

La teneur en anthocyanines a été déterminée selon l'équation :  $C = (A.MW.FD.4000)/\epsilon$

**C** : teneur en anthocyanines (g ECy-3-Glu/100 g de poids sec)

**A** : absorbance.

**MW** : poids moléculaire de la cyanidine-3-glucoside (Cy-3-Glu) (449,2 g/mole).

**FD** : facteur de dilution

**ε** : coefficient d'extinction molaire (26900) de la cyanidine-3-glucoside



**Figure 24** : schéma de la procédure chromatographique sur couche mince/haute performance adoptée dans la présente étude.

## **2. Caractérisation chromatographique**

### **2.1. Caractérisation chromatographique des huiles essentielles de *P. scoparius***

#### **2.1.1. TLC et HPTLC-densitométrie des huiles essentielles de *P. scoparius***

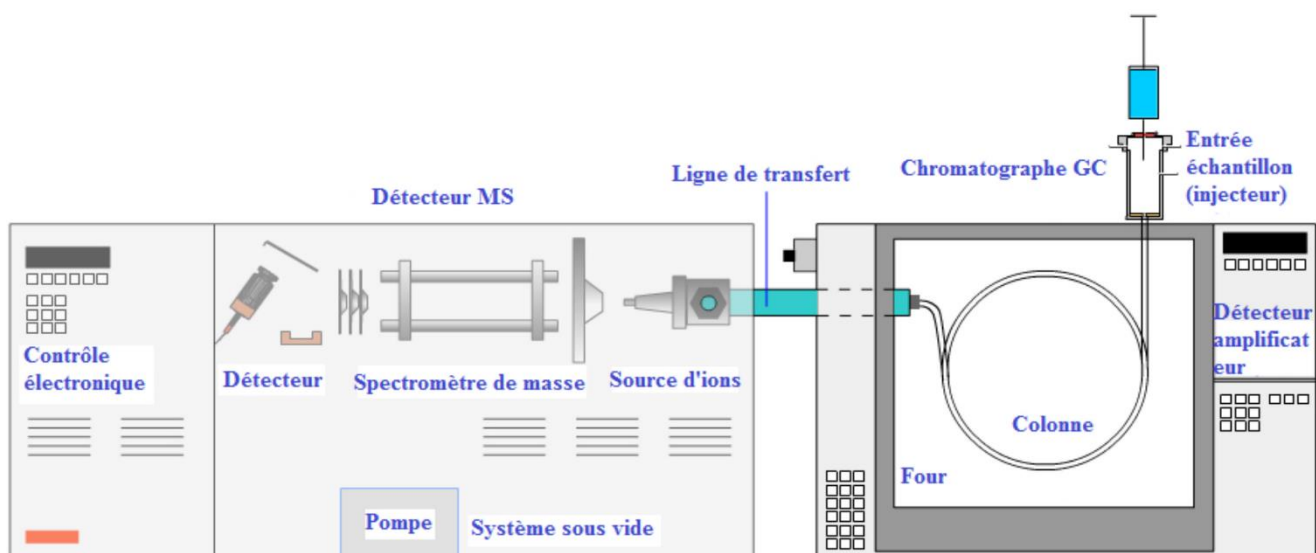
Pour la présente analyse chromatographique (Figure 24), les EsO de *P. scoparius* issues de l'extraction par hydrodistillation à partir des tiges fraîches (fresh plant : FP) et sèches (dried plant : DP) de la plante. Ces EsO ont été diluées avec de l'acétate d'éthyle à 1:30 (v/v). Pour le screening des terpènes sur couche mince, une plaque de gel de silice 60 couche mince (TLC) de dimensions 5 cm X 10 cm (Merck, Darmstadt, Germany) (Lot n° 1. 05553) a été utilisée. La plaque a été développée dans une chambre de développement chromatographique à double puits (CAMAG, Muttenz, Switzerland). Un volume de 5  $\mu$ L de la solution de l'EsO diluée a été appliqué sous forme de bandelettes de 5 mm d'épaisseur, à 8 mm du bas de la plaque et à 15 mm du bord gauche de la plaque (l'espace entre deux bandes successives a été fixé à 10 mm), à l'aide d'une seringue CAMAG d'un volume de 25  $\mu$ L en utilisant un échantillonneur automatique CAMAG ATS4 sur la plaque TLC à 1 cm du bord inférieur de la plaque. Celle-ci a été d'abord développée dans l'isooctane sur une hauteur de 8 cm de la plaque (qui délimite le front de migration des composés de l'EsO). Le second développement a été effectué sur une hauteur de 5 cm de la plaque, avec un solvant de développement constitué de n-hexane-acétate d'éthyle (5:1, v/v). Pour les deux développements chromatographiques, 10 mL du solvant de développement (isooctane et mélange de n-hexane-acétate d'éthyle) a été utilisé sans saturation préalable de la chambre de développement. Une fois le développement achevé, la plaque a été séchée par de l'air relativement ambiant (séchoir domestique) avant l'étape de révélation chimique. La révélation post-chromatographique a été réalisée en chauffant la plaque (au préalable développée) à 110 °C pendant 3 min sur une plaque chauffante type CAMAG. Immédiatement après le chauffage, la plaque a été pulvérisée avec le réactif de détection et de révélation (quelques sprays avec le réactif Anisaldéhyde sur la plaque) pendant 1 min. La capture d'images de la plaque chromatographique a été effectuée à l'aide du système d'image DigiStore 2 (CAMAG) qui opère à l'aide du logiciel WinCATS version 1.4.1.8154. En parallèle à ce développement chromatographique, un autre développement sur une plaque couche mince haute performance (HPTLC) a été effectué pour l'analyse densitométrique. A cet effet, une plaque HPTLC gel de silice 60 (F<sub>254</sub>) munie d'un agent fluorescent sous UV de dimensions 10 cm X 10 cm (Merck, Darmstadt, Germany) (Lot n° 1. 05629). La même procédure de développement chromatographique précédente a été adoptée, avec dépôt de 10  $\mu$ L de solutions étalons ( $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène,  $\alpha$ -terpinène,  $\alpha$ -phellandrène et p-cymène) préparées dans l'acétate

d'éthyle pur (0,1 mL/0,2 mL, v/v). Les plaques ont été scannées à  $\lambda = 500$  nm en utilisant un Scanner TLC III (CAMAG), la dimension de la fente a été maintenue à 3,00 mm X 0,30 mm avec une vitesse de balayage de 20 mm/s et une résolution des données de 100  $\mu\text{m/pas}$ .

### **2.1.2. Analyse des composés volatils par MHE-GC-FID-MS**

Cette analyse a été effectuée sur chromatographe gazeux Focus GC (Thermo Fisher Scientific, USA) couplé à un échantillonneur automatique headspace HS 40 XL (Perkin Elmer, USA). L'identification GC-MS a été effectuée sur un chromatographe gazeux GC Trace Ultra couplé à un spectromètre de masse de type DSQ II single-quad (Thermo Fisher Scientific, USA). Les conditions opératoires pour MHE et GC-FID sont comme suit : gaz vecteur (hélium), température du four (145 °C), température de l'aiguille d'injection (265 °C), température de transfert (190 °C), pressurisation (270 kPa), temps du thermostat (35 min), temps de pressurisation (0,6 min) et temps d'injection (0,04 min). Nombre d'injection MHE (3), débit d'écoulement (2,0 mL/min, écoulement constant), rapport split (1:25), température d'entrée (280 °C), température du détecteur FID (280 °C). Caractéristiques de la colonne GC : ZB-5MSi, 30 m X 0,25 mm X 0,25  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, USA), programme de température dans le four : 50 °C (0,5 min) à 105 °C (15 °C/min), puis 180 °C à 30 °C/min et 250 °C à 10 °C/min (1 min).

L'identification MHE-GC-MS des composés volatils a été réalisée en injectant des solutions (EsO-acétate d'éthyle) de 1% (v/v). Les échantillons de la plante sont d'abord séchés à 50-60 °C dans une étuve ventilée, puis broyés et homogénéisés dans un micro-démembreur (Mikro-Dismembrator S, Sartorius, Germany) pour obtenir une fine poudre. Une masse de 20 mg de cette poudre homogénéisée est disposée dans un flacon HS, avec addition de 20 mL d'eau et 10  $\mu\text{L}$  de méthanol. L'analyse MHE-GC a été réalisée par trois injections séquentielles en HS à partir des flacons échantillon et étalon. Les pics chromatographiques ont été inféodés à trois groupes : monoterpènes, diterpènes et composés oxygénés (composés aromatiques et terpènes alcools). Les pics des groupes de monoterpènes et diterpènes ont été quantifiés par les étalons  $\beta$ -pinène et limonène, alors que le groupe des composés oxygénés a été quantifié par l'étalon *trans*-anéthol. Les conditions opératoires pour l'analyse GC-MS sont comme suit : gaz vecteur (He), débit d'écoulement (1,0 mL/min, écoulement constant), rapport split (1:25), température d'entrée (280 °C), volume d'injection (0,5  $\mu\text{L}$ ), température de la ligne de transfert (280 °C), température de la source MS (200 °C), énergie d'ionisation (+70eV), plage de balayage (40-250 m/z), colonne GC J&W: ZB-5HT, 20 m X 0,18 mm X 0.18  $\mu\text{m}$ , programme



**Figure 25** : schéma descriptif du dispositif GC-MS de la présente étude.

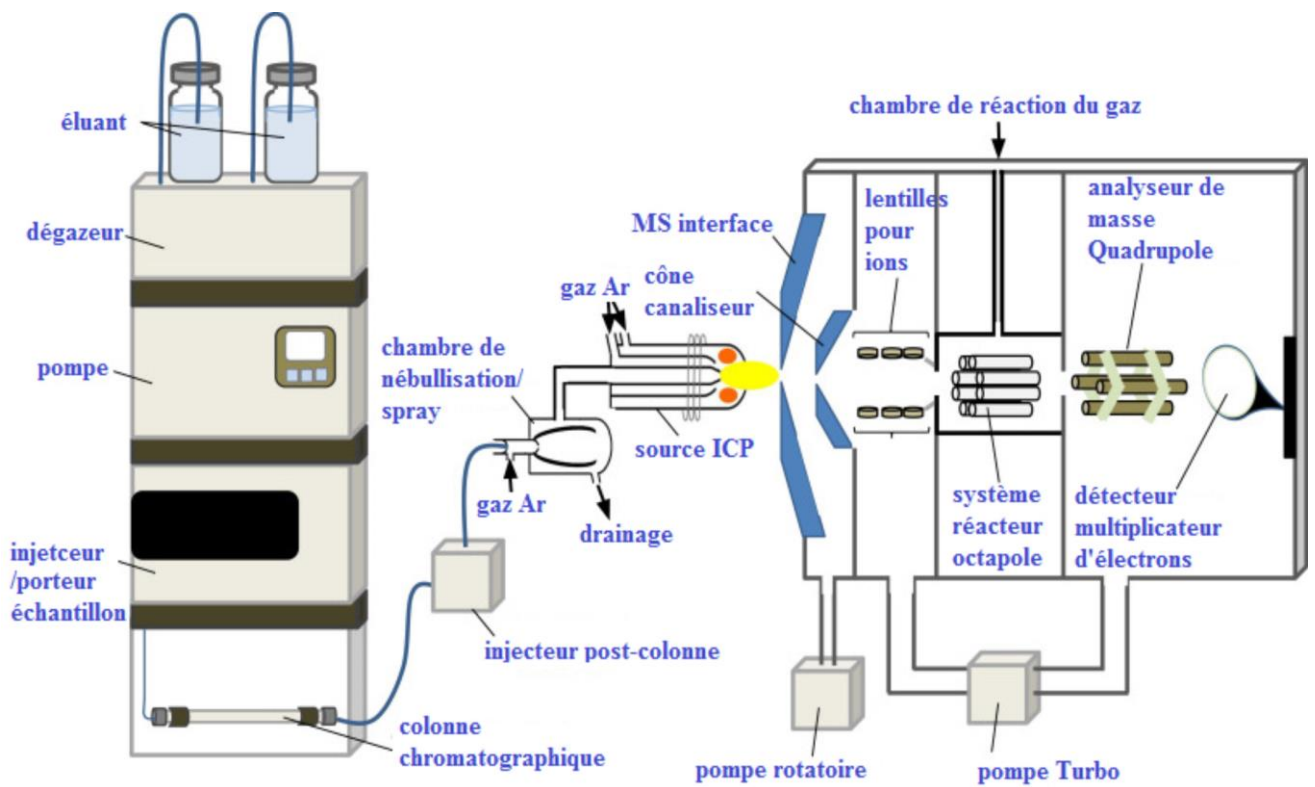
de température dans le four: 50 °C (0,5 min), 105 °C à 15 °C/min, 180°C à 30 °C/min et enfin 250 °C à 10 °C/min (1min).

### **2.1.3. Analyse GC-MS des huiles essentielles de *P. scoparius* obtenues**

Les EsO obtenues par hydrodistillation des tiges de la plante fraîche (FP) et sèche (DP) sont analysés par GC-MS (Figure 25). Des solutions des huiles essentielles à 1% (v/v) diluées dans de l'hexane ont été injectées. Les solutions des standards suivants:  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène,  $\alpha$ -phellandrène,  $\alpha$ -terpinène, p-cymène, limonène,  $\gamma$ -terpinène et carvone ont été préparées dans de l'hexane pur à une concentration de 200 ppm. Le chromatographe gazeux GC Thermo Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, USA) équipé d'une colonne capillaire en silice fondue ZB-5HT (20 m X 0,18 mm X 0,18  $\mu$ m) couplé à un spectromètre de masse Thermo DSQ II (Thermo Fisher Scientific, USA). La température a été programmée de 50 °C (1 min), 150 °C à 3 °C/min et à 5°C/min jusqu'à 260 °C avec un laps de temps d'une minute. L'hélium (He) a été utilisé comme gaz vecteur (0,6 mL/min), injection en mode split (1:25), température de l'injecteur de 280 °C. Le spectromètre de masse en mode EI à 70 eV. L'identification des composés est basée sur l'appariement de leurs spectres de masses avec ceux de la bibliothèque spectrale du NIST (NIST MS Search 2,0, 2005) ainsi que la comparaison de leurs indices de rétention avec les indices de la base de données NIST. Les indices de rétention ont été calculés avec la formule de Van den Dool et Kratz. La colonne et la méthode ont été transférées au chromatographe Thermo Focus GC, muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) pour le dosage quantitatif.

### **2.1.4. Analyse de l'huile essentielle par chromatographie bidimensionnelle GCxGC**

L'analyse GCxGC a été réalisée à l'aide d'un système chromatographique 2D Agilent 7890N (Agilent, USA), équipé d'un modulateur de débit. Le détecteur utilisé est le FID à 250 °C. Le programme de température du four a été de 70 °C (2min) – 7 °C/min – 240 °C (15 min). La température d'entrée a été de 250 °C. Le dispositif de colonnes à deux dimensions était composé d'une première colonne composée d'un liquide ionique (4MPyC6, 30m x 0,25 mm x 0,2 MKM; dite colonne 1) et d'une seconde colonne HP-5 (5m x 0,25 mm x 0,2 MKM, dite colonne 2). L'hélium de pureté analytique a été utilisé comme gaz vecteur. L'échantillon a été injecté en utilisant le mode split 1:100. Les vitesses d'écoulement pour les colonnes 1 et 2 étaient respectivement de 1 et 25 mL/min avec un temps de modulation correspondant à 1,4 s.



**Figure 26** : schéma descriptif du dispositif HPLC-MS de la présente étude.

## **2.1.5. Analyses GC-MS et GCxGC des huiles essentielles de *P. scoparius***

### **2.1.5.1. Analyse chromatographique par GC-MS**

L'identification chromatographique des EsO issues de l'extraction par hydrodistillation à partir des tiges (EsOS) et des fleurs (EsOF) de *P. scoparius* a été effectuée à l'aide d'un système GC-MS Agilent 7000 (Agilent, USA), équipé d'une colonne capillaire en silice fondue HP-ms (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm). La température a été programmée de 60 °C (5 min), 150 °C à 5 °C/min puis à une vitesse de 15 °C/min jusqu'à 240 °C avec un laps de temps de 10 min. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (1 mL/min), injection en mode split (1:200) avec une température de l'injecteur de 280 °C. Le spectromètre de masse est mis en mode EI à 70 eV, avec une plage de balayage de 40-400 m/z. L'identification des composés a été basée sur l'appariement de leurs spectres de masse avec ceux de la bibliothèque spectrale du NIST 11 (NIST MS Search 2,0, 2005) ainsi que sur la comparaison de leurs indices de rétention avec les indices de la base de données du NIST.

### **2.1.5.2. Analyse chromatographique par GCxGC**

L'analyse GCxGC a été réalisée à l'aide d'un système chromatographique 2D Agilent 7890N (Agilent, USA), équipé d'un modulateur de débit. Le détecteur utilisé est le FID à 250 °C. Le programme de température du four a été de 90 °C (3 min) - 8 °C/min - 240 °C (15 min) et la température d'entrée de 250 °C. Le dispositif bidimensionnel 236 est composé d'une colonne customisée contenant un liquide ionique (N-Propyl4MPy, 25 m X 0,25 mm X 0,2 µm; identifiée comme colonne 1) et d'une HP-5 (5 m X 0,25 mm X 0,2 µm, identifiée comme colonne 2). L'hélium de pureté analytique a été utilisé comme gaz vecteur. L'échantillon a été injecté en mode split 1:100. Les vitesses d'écoulement pour la colonne 1 et la colonne 2 étaient respectivement de 1 et 25 mL/min et un temps de modulation de 1,5 s.

## **2.2. Analyse chromatographique des extraits polyphénoliques**

### **2.2.1. Analyse de l'extrait aqueux de *P. scoparius* par HPLC-DAD-ESI-MS**

L'extrait aqueux présentant le meilleur pouvoir réducteur (décocté aqueux à 5% de poudre) a fait l'objet de la présente caractérisation chromatographique (Figure 26). Le protocole adopté pour la séparation et la caractérisation des polyphénols dans l'extrait est celui de Mitja *et al.* (2007). L'analyse chromatographique a été réalisée à l'aide d'un système HPLC Thermo Accela 600 (Thermo Fisher Scientific, USA) équipé d'un injecteur/échantillonneur automatique, un dégazeur sous vide, une pompe quaternaire et muni d'un détecteur UV-Vis à matrice de photodiode (PDA) et le système est couplé à un spectromètre de masse Thermo Triple Quadrupole (TSQ), avec ionisation par électronébuliseur (ESI) opérant en mode ionisation négative (Thermo Electron Corporation, San Jose, Ca, USA). La séparation



chromatographique des composés phénoliques a été obtenue sur une colonne Kinetex XB-C18 Phenomenex (50 mm X 2,1 mm X 2,6 µm, Phenomenex Inc. Torrance, CA, USA). Les conditions de séparation sont comme suit: phase mobile A (eau avec 0,1% acide formique) et phase mobile B (acétonitrile (ACN) avec 0,1% d'acide formique). Le gradient d'élution en % de B a commencé à 5%, puis à 20% en 20 min, à 30% en 20,1 min et enfin maintenu pendant 5 à 6 min pour le nettoyage et l'équilibrage des colonnes. La température de la colonne, le débit et le volume d'injection ont été de 22 °C, 300 µL/min et 5 µL respectivement. La détection quantitative par UV-Vis a été effectuée à 330 nm et l'analyse qualitative par MS a été entreprise dans la plage des masses (m/z): 340-650. Le dispositif d'analyse a été contrôlé par le biais du logiciel Thermo Xcalibur v. 2.1.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) utilisé également pour le traitement des données.

### **2.2.2. Caractérisation par HPTLC des extraits d'*H. sabdariffa* étudiés**

Le criblage des composés phénoliques a été effectué par chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) (Figure 24). Le type de plaques utilisées est le gel de silice 60 avec fluorescence (F<sub>254</sub>) dont les dimensions sont 10 cm X 10 cm (Merck, Allemagne) (Lot n° 1. 05641). Le développement chromatographique s'est effectué dans une chambre à double puits (CAMAG, Muttenz, Suisse) suivant le protocole de Simonovska *et al.* (2003). Un volume de 16 µL des extraits étudiés et 2 µL des solutions étalons ont été appliqués sur la plaque sous forme de bandes de 5 mm d'épaisseur, à 8 mm du bas de la plaque et à 15 mm du bord gauche de la plaque (l'espace entre deux bandes a été fixé à 10 mm) avec une seringue CAMAG (volume de la seringue de 25 µL) à l'aide d'un échantillonneur automatique ATS4 (CAMAG), déposant les extraits sur la plaque HPTLC à 1 cm du bord inférieur de celle-ci. La plaque a été développée dans des conditions de saturation préalable (par les vapeurs du système de développement) pendant 15 min et sur une distance de 80 mm (front de migration) en utilisant un système de développement constitué des solvants acétate d'éthyle, d'eau et d'acide formique (85:15:10; v/v/v). Après développement, la plaque a été séchée sous un courant d'air chaud (en utilisant un séchoir domestique), chauffée sur une plaque chauffante (CAMAG) à 110 °C pendant 3 min et pulvérisée avec de l'acide diphénylborique-2-amino éthylester (réactif NST, solution à 1% dans du méthanol pur) pendant quelques secondes. Ensuite, la plaque a été trempée dans un mélange paraffine – n-hexane (1:2, v/v) dans le dispositif de trempage (immersion) pour l'amélioration de la fixation du réactif de révélation. Après avoir séché avec de l'air chaud et soigneusement nettoyé le dos de la plaque en verre, la plaque a été photographiée à 366 nm et sous la lumière blanche en utilisant le système de documentation photographique DigiStore 2 (CAMAG) opérant avec le logiciel winCATS version 1.4.1.8154.

## **2.3. Evaluation de l'activité antiradicalaire par la méthode TLC-DPPH•**

### **2.3.1. Activité antiradicalaire des huiles essentielles de *P. scoparius* par TLC-DPPH•**

Une solution fraîche de DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) a été préparée en dissolvant 0,2 g du réactif dans 100 mL de méthanol pur de façon à obtenir une solution de 0,2% (m/v). L'évaluation de l'activité antiradicalaire des EsO (FP) et (DP) suivant le protocole de Cieśła *et al.* (2012). Une plaque TLC gel de silice 60 sans fluorescence de dimensions 5cm X 10cm (Merck, Allemagne) (Lot n° 1.05553) a été développée suivant la procédure de TLC décrite en précédemment (Figure 24), puis immergée pendant 5 s par le biais du dispositif de trempage (Chromatogram Immersion Device III, CAMAG). La plaque a été laissée sécher à l'obscurité pendant quelques secondes, protégée de la lumière du jour en couvrant l'ensemble dispositif d'immersion+plaque avec du papier aluminium pendant 30 min (le temps de fixer la coloration de la solution sur la plaque). L'expérience a été réalisée à température ambiante, la plaque a été immédiatement photographiée en utilisant le système de documentation photographique DigiStore 2 (CAMAG), piloté par le logiciel winCATS version 1.4.1.8154 et l'usage de la lumière blanche.

### **2.3.2. Activité antiradicalaire des extraits d'*H. sabdariffa* par HPTLC-DPPH•**

La plaque HPTLC gel de silice 60 sans fluorescence utilisée, de dimensions 10 cm X 10 cm (Merck, Allemagne) (Lot n° 1. 05641), a été développée dans une chambre de développement chromatographique à double puits (CAMAG, Muttenz, Suisse) selon le même protocole décrit par Simonovska *et al.* (2003) (Figure 24). Après développement de la plaque, celle-ci a été séchée sous un courant d'air chaud puis immergée 5 s dans le dispositif de trempage (Chromatogram Immersion Device III, CAMAG) dans une solution fraîche de DPPH• (0,2% dans le méthanol pur; m/v) selon le protocole décrit précédemment. La plaque a été protégée de la lumière du jour en couvrant le dispositif d'immersion avec du papier aluminium, après avoir débarrassé l'excès de DPPH• retenu par le bas de la plaque avec de légers mouvements de va-et-vient à partir de l'une des extrémités des bords supérieurs de la plaque. Celle-ci est laissée à l'obscurité pendant 30 min, en maintenant la plaque légèrement inclinée contre le dispositif d'immersion. Ensuite, la plaque est immédiatement photographiée sous la lumière blanche en utilisant le système de documentation photographique DigiStore 2 (CAMAG) piloté par le logiciel winCATS version 1.4.1.8154.

## **2.4. Analyses chromatographiques des huiles végétales**

Les huiles végétales rentrant dans la constitution de la phase grasse des émulsions étudiées (PO, SBO et SFO) ont été caractérisées par chromatographie en termes de composition en AG, TAG et composés mineurs (tocophérols et phytostérols). Les protocoles utilisés ont été adaptés pour les besoins de la présente étude.

### **2.4.1. Analyse de la composition en acides gras par GC-MS**

Avant d'analyser les huiles végétales pour leurs teneurs en acides gras, une étape de préparation des échantillons est primordiale. Pour ce faire, 5-10 mg de l'échantillon à analyser a été dissous dans 1 mL de solution d'acide sulfurique à 5% (méthanol pur). 200  $\mu$ L de toluène et 2 mg d'un étalon interne (undécanoate de méthyle) ont été ajoutés après chauffage de la solution à 90 °C pendant 1 h. Ensuite, 100  $\mu$ L d'eau distillée ont été ajoutés et les esters méthyliques d'acides gras formés ont été extraits à l'aide de 400  $\mu$ L d'hexane.

Afin de quantifier et d'identifier les esters méthyliques d'acides gras, l'analyse GC et l'identification par MS ont été effectuées par un système GC-MS Agilent 7000 (Agilent, USA) équipé d'une colonne à liquide ionique (N-Propyl4MPyNtf2, 25 m X 0,25 mm X 0,2  $\mu$ m). La programmation de température a été de 90 °C (3 min), puis 230 °C à 8 °C/min. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (1 mL/min), injection en mode split (1:30) et la température de l'injecteur à 250 °C. Le spectromètre de masse opérant en mode EI (70 eV) dans une plage de balayage 40-400 m/z. L'identification des composés est basée sur l'appariement de leurs spectres de masse avec ceux de la bibliothèque spectrale de masse du NIST 11 (NIST MS Search 2,0, 2005).

### **2.4.2. Analyse de la composition en triglycérides par LC-MS**

L'analyse du profil en triglycérides des huiles végétales étudiées a été effectué à l'aide d'un système chromatographique Shimadzu HPLC-MS 2020 (Shimadzu Corporation, Japan), équipé d'une colonne type PerfectSil cible ODS-3 C18 (250  $\times$  4,6 mm). Les données ont été collectées et traitées à l'aide du logiciel Lab Solution v. 5,53. Le système méthanol: isopropanol (70:30, v/v) a été utilisé comme phase mobile. Les caractéristiques du système chromatographique sont comme suit : volume d'injection (5  $\mu$ L), débit de la phase mobile (1 mL/min), température de la colonne (50 °C), mode d'ionisation (ESI/APCI) et la plage des masses (m/z) balayées (100-1000).

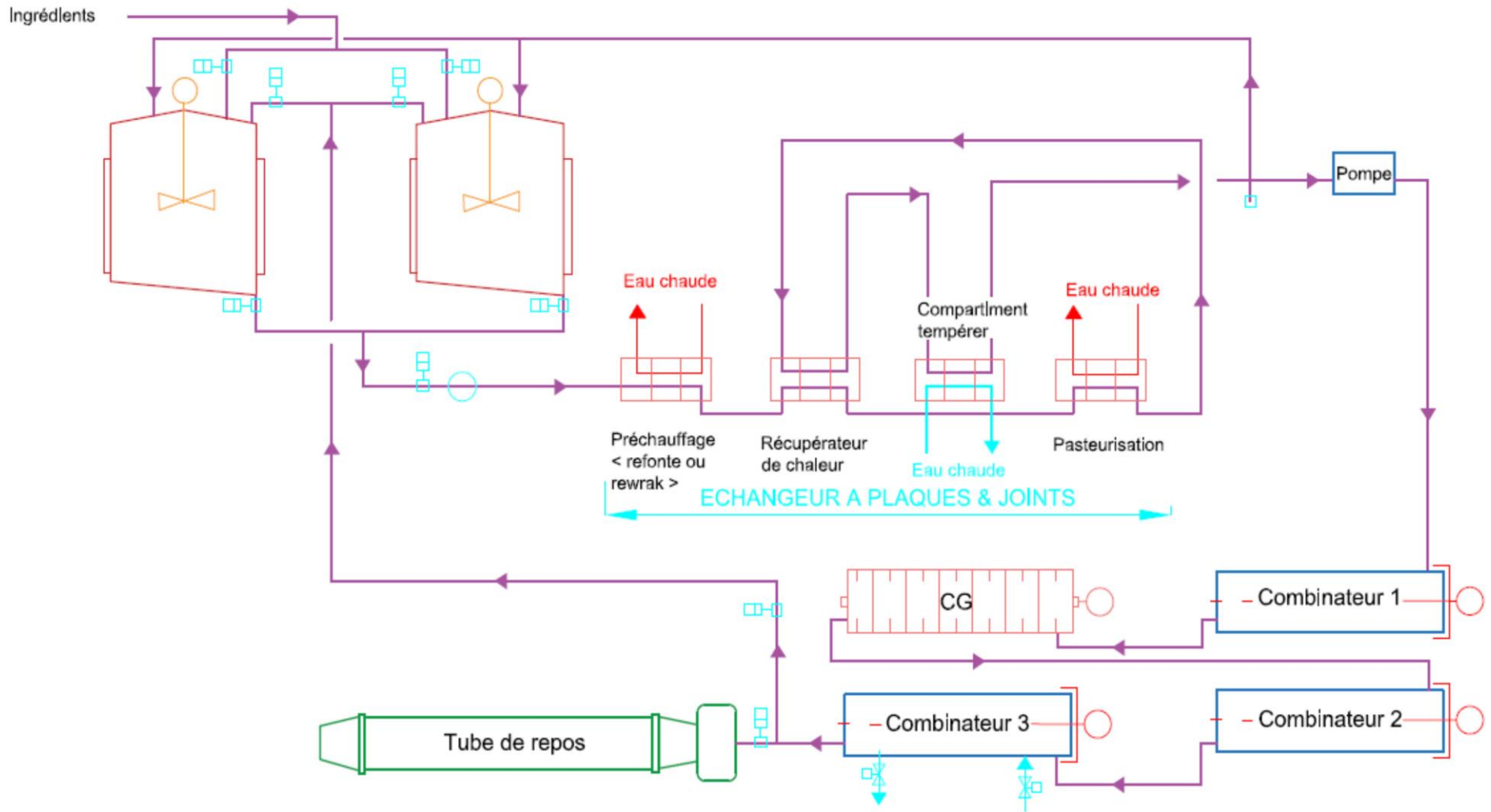
### **2.4.3. Analyse des tocophérols et phytostérols**

L'analyse de ces composés mineurs réputés pour être des antioxydants natifs dans les huiles végétales requiert une préparation des échantillons. Une masse de 100 mg d'échantillon de l'huile végétale a été dissoute dans 2 mL de solution d'éthanol à 10% de KOH. Après avoir chauffé la solution à 60 °C pendant 1 h, 100 mL de solution d'acide ascorbique à 20% (dans l'éthanol) a été ajoutée. Ensuite, 2 mL d'eau distillée a été ajoutée à la solution pour obtenir un mélange, dont un volume de 2 mL d'hexane a été ajouté pour l'extraction. Une seconde extraction a été effectuée à nouveau avec 2 mL d'hexane. Les extraits obtenus étant combinés, l'étalon interne a été ajouté (acétate de tocophérol à 50 ppm). La solution a été séchée par du sulfate de sodium et l'hexane est éliminé par un séchage par évaporation à l'aide d'Ar (argon). Le résidu a été traité avec du BSTFA (50 µL) dans la pyridine (100 µL) pendant 1 h à 60 °C. L'identification et la quantification des tocophérols et des phytostérols ont été effectuées à l'aide d'un système GC-MS Agilent 7000 (Agilent, USA), équipé d'une colonne de type VF-5ms (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm). La température a été programmée de 140 °C (3 min), puis 300 °C à 10 °C/min. l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (1,2 mL/min) et les conditions opératoires ont été établis comme suit : injection en mode split (1:5), température de l'injecteur à 300 °C. Le spectromètre de masse en mode EI à 70 eV, dont la plage de balayage des masses (m/z) est de 40-600. L'identification des composés est basée sur l'appariement de leurs spectres de masse avec ceux de la bibliothèque spectrale de masse du NIST 11 (NIST MS Search 2,0, 2005).

## **3. Elaboration des émulsions**

### **3.1. Emulsion formulée à l'échelle laboratoire**

L'émulsion à base de lactosérum et à caractère spread (matière grasse à tartiner) est formulée sur la base de trois composantes principales: la phase grasse (82%), la phase aqueuse (16%) et les additifs (2%). La formulation a été réalisée à l'échelle laboratoire. La phase grasse contient un mélange de trois huiles: l'huile de palme (PO), l'huile de tournesol (SFO) et l'huile de soja (SBO). Les ingrédients liposolubles (l' $\alpha$ -tocophérol ou l'EsO de *P. scoparius*) ont été dissous dans un bécher et ajoutés au mélange des huiles végétales constituant la phase grasse. La phase aqueuse contient les ingrédients hydrosolubles : lactosérum liquide pasteurisé, sel, sorbate de potassium, acide citrique et colorant (Anatto curcumine OSS 3525).



**Figure 27** : schéma fonctionnel de la chaine pilote (adapté à partir d'un document interne à l'entreprise CEVITAL SPA).

Parallèlement à cette émulsion, d'autres émulsions contenant l'extrait aqueux à 5% de poudre de *P. scoparius* ont été formulées. Cet extrait a été d'abord concentré à 40 °C par évaporation dans un Rotavapeur (Heidolph, Allemagne), avant d'être incorporé à différentes concentrations (100, 300, 600, et 900 ppm). Les deux phases (grasses et aqueuses) ont été versées dans un petit tank en acier inoxydable, où l'émulsification a lieu avec agitation continue pendant 20 min (par le biais d'un agitateur mécanique). A ce stade, la stabilité de l'émulsion est incomplète et une cristallisation est obligatoire. Celle-ci a été effectuée au sein même du tank en acier inoxydable placé dans un bac à glace, afin d'assurer un refroidissement permettant la formation des premiers cristaux. L'agitation a été maintenue pendant toute la durée de l'opération d'émulsification pour assurer son homogénéité. Deux émulsions ont été préparées:

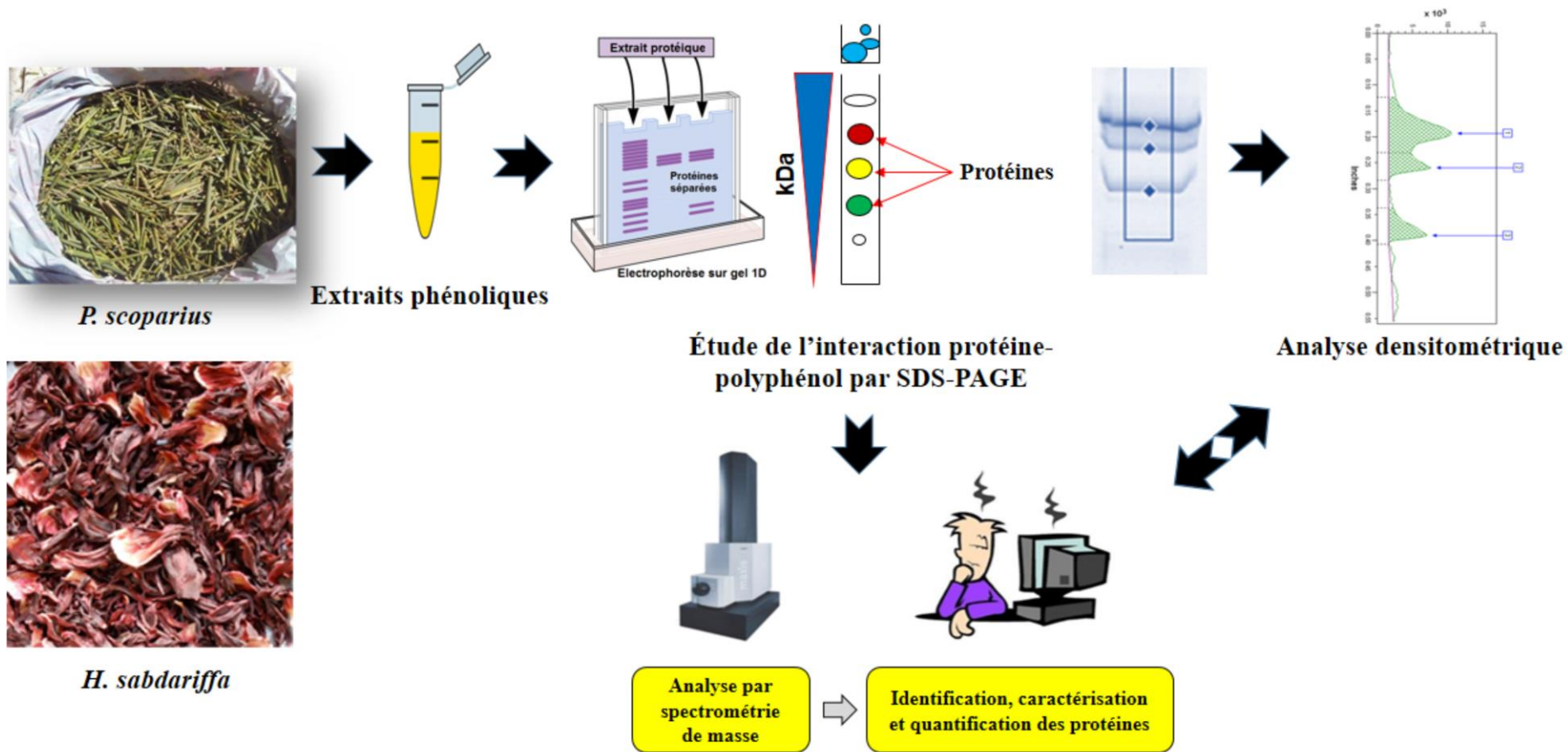
- ♣ Des émulsions contenant soit l'EsO ou bien l'extrait aqueux de *P. scoparius* à différentes concentrations (100, 300, 600 et 900 ppm) comme agents bioconservateurs (émulsions de l'étude);
- ♣ Une émulsion contenant l' $\alpha$ -tocophérol comme antioxydant dans la phase grasse (émulsion témoin).

Les émulsions formulées ont été conditionnées dans des boîtes de 250 g chacune et entreposées dans un réfrigérateur à 4 °C jusqu'à analyse.

### **3.2. Emulsion formulée à l'échelle pilote**

Les extraits de *H. sabdariffa* montrant des pouvoirs réducteurs élevés ont été sélectionnés pour l'incorporation dans l'émulsion. Ils ont été au préalable concentrés par évaporation dans un rotavapeur (Heidolph, Allemagne) à 40 °C pour être incorporés dans une émulsion élaborée à l'échelle pilote (Figure 27).

L'émulsion formulée à base de lactosérum type spread (à tartiner) est constituée de deux phases. La phase grasse (82%) contenant les huiles végétales de soja (SBO), de tournesol (SFO) et de de palme (PO) (2:1:1; w/w/w) et la phase aqueuse (16%) contenant un lactosérum brut récupéré durant l'étape d'égouttage du fromage, généreusement donné par une laiterie-fromagerie locale (SAFILAIT SPA, Constantine, Algérie). Le lactosérum brut a été pasteurisé avant son utilisation (70 °C/20 min). L'acide lactique a été employé comme agent correcteur de pH et émulsifiant, tandis que l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) a été utilisé comme antioxydant dans la phase grasse de l'émulsion témoin. Les huiles végétales ont été chauffées jusqu'à fusion dans un tank à 65 °C, puis pesées en conséquence pour une quantité de 10 kg (quantité minimale à mettre en œuvre dans la chaîne pilote). La phase aqueuse a été ajoutée lentement au mélange,



**Figure 28** : schéma général de l'étude des interactions protéine-polyphénols.

avec une agitation isotherme et continue à 45 °C pendant 30 min pour assurer l'homogénéité de l'émulsion. Le mélange est passé ensuite dans la chaîne pilote (Gerstenberg Schroder, Germany). L'émulsion a été pompée jusqu'à la section de pasteurisation, chauffée à 80 °C (3-4 s) sous pression de vapeur (3 bar) et directement refroidie à 45 °C. Le tube refroidisseur a un volume de 3 kg, alors que le malaxeur à broches a un volume de 0,5 kg. L'émulsion a été pompée dans le tube refroidisseur pour refroidissement à 22 °C. Elle atteint sa consistance dans le malaxeur à broches à une température de 13 °C. Le racloir est porté à une vitesse de rotation de 300 tr/min et le malaxeur à broches agitateur à 400 tr/min. L'émulsion est récupérée au final à la sortie du malaxeur à broches. 250 g d'émulsion et 25 mg de chaque extrait (25 mg de l' $\alpha$ -tocophérol pour l'émulsion témoin) ont été pesés et mis dans des boîtes de 250 g chacune. Le mélange (émulsion + extrait) est vigoureusement remué à l'aide d'une spatule pendant 5 min (homogénéisation), puis placé dans un congélateur pendant 1 h afin d'achever la cristallisation. L'émulsion est entreposée dans un réfrigérateur (6 °C) jusqu'à utilisation.

#### **4. Analyse des interactions protéine-polyphénols**

##### **4.1. Détermination de la teneur en protéines**

La concentration protéique a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) à l'aide du dosage des protéines de Bio-Rad (BIO-RAD). L'albumine du sérum bovin ou BSA (Bovin Serum Albumin) a été utilisée comme étalon à une concentration de 1 mg/mL.

##### **4.2. Interactions protéine-polyphénols dans la phase aqueuse**

Pour l'analyse de la phase aqueuse en vue de son analyse par électrophorèse, les émulsions (témoin et échantillons) ont été incubées dans un bain Marie réglé à 40 °C. Ceci permet la fusion de l'émulsion, la séparation des deux phases et la récupération de la phase aqueuse. Celle-ci est récupérée après avoir éliminé la phase grasse, en utilisant une micropipette ou pipette Pasteur. L'eau ainsi récupérée constitue la phase aqueuse de l'émulsion. Des aliquotes des phases aqueuses des émulsions témoin et échantillons ont été centrifugées à 4000 tr/mn pendant 10 min à 10 °C, les surnageants ont été collectés et filtrés à l'aide d'une membrane filtrante d'une porosité de 2  $\mu$ m (Millipore, Billerica, ma, USA). Ils sont ensuite préparés pour l'électrophorèse par Tricine SDS-PAGE selon le protocole de Gagaoua *et al.* (2014) adapté de Laemmli (1970), Schägger (2006) et Haider *et al.* (2012) (Figure 28).

##### **4.3. Interactions protéine-polyphénols par LC-ESI-MS/MS**

La même procédure décrite précédemment a été adoptée pour la récupération de la phase aqueuse de l'émulsion incorporée par les extraits d'*H. sabdariffa* étudiés.

Dans un intérêt d'étudier la nature des protéines impliquées dans les interactions entre les protéines du lactosérum et les polyphénols issus de l'Hibiscus, les bandes protéiques



apparaissant sur les puits du gel (correspondant aux phases aqueuses des émulsions analysées) ont été excisées du gel et une digestion « in-gel » avec la trypsine a été réalisée durant la nuit. Les peptides obtenus à partir de chaque bande ont été dissous dans 0,1% d'acide trifluoroacétique et analysés par HPLC (Thermo Scientific Surveyor Plus, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) couplé à un spectromètre de masse à trape ionique (Thermo Finnigan LCQ Advantage, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) opérant en mode ionisation par électronubélisation (ou électrospray) (ESI). La séparation des peptides a été effectuée sur une colonne de type Jupiter Proteo C18 (150 mm x 0,5 mm; Phenomenex, Torrance, ca). Les paramètres opératoires en MS sont: ionisation électrospray en mode positif; température du capillaire, 250 °C; énergie de collision normalisée à 35%; tension de pulvérisation, 4,5 kV; tension capillaire, 33,0 V. Le premier événement de balayage est réalisé par la détection complète en MS des valeurs (m/z) dans la plage 400-2000. Le deuxième événement de balayage a été réalisé par une analyse MS/MS dépendante des données des ions les plus intenses ayant des charges de + 1 à + 4. Le système LC-MS et l'acquisition des données ont été contrôlés par le logiciel Thermo Scientific Xcalibur v 2.07. L'identification des peptides a été effectuée à partir des informations liées aux données spectrales MS/MS générées à l'aide d'une version interne du moteur de recherche Mascot v 2.3 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) contre la base de données protéiques UniProt KB ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). L'option « Mammalia » a été sélectionnée comme paramètre de restriction de taxonomique.

### **5. Etude de la stabilité oxydative des émulsions par le test Rancimat**

Dans ce test, les matières grasses (émulsions) subissent un vieillissement prématuré par décomposition thermique à une température spécifiée et sous un bullage intensif d'air. La stabilité oxydative, ou la résistance à l'auto-oxydation des émulsions étudiées, a été déterminée par un test d'accélération de l'oxydation ou test au Rancimat par le biais d'un appareil lui-même appelé Rancimat (Metrhom 743, Herisau, Suisse) selon la norme ISO 6886 (méthode normalisée ISO internationale, 2006). Dans les conditions opératoires du présent travail, la température du système est amenée à 98 °C dans le bloc chauffant à l'aide du thyristor et du thermomètre de contact. A l'aide d'une micropipette Pasteur, une masse de 3 g de l'échantillon est introduite dans le flacon d'oxydation à l'air. De l'air sec est introduit par la mise en marche de la pompe à gaz à un débit d'air fixé à 10 L/h. Les tubes d'arrivée et de sortie d'air sont reliés aux flacons d'oxydation à l'air et aux cellules de mesure par les tubes de raccordement. Le flacon d'oxydation à l'air muni de son bouchon hermétique est introduit dans le trou correspondant dans le bloc chauffant. Les acides organiques, produits de dégradation de cette oxydation poussée, sont entraînés par le courant d'air sec et recueillis dans la cellule de mesure

contenant de l'eau bidistillée (50 mL) dans laquelle est immergée une électrode de mesure de la conductivité. Le temps est déterminé par conductimétrie et correspond au TIR (Temps d'Induction au test Rancimat) ou période d'induction. La fin de celle-ci est indiquée lorsque la conductivité se met à augmenter rapidement. Cette augmentation accélérée est provoquée par l'accumulation de ces produits d'oxydation volatils. Les mesures sont arrêtées au moment précis où le signal a atteint 100% de l'échelle de l'enregistreur (généralement 200 $\mu$ S/cm). La limite maximale du test est de 48 heures.

## **6. Effets des huiles essentielles de *P. scoparius* sur la cristallisation des lipides**

Pour comprendre l'effet probable des EsO de *P. scoparius* sur la microstructure des émulsions étudiées, il était impératif de focaliser l'étude sur la phase grasse des émulsions abordées. Celle-ci est constituée des huiles végétales précédemment citées (PO, SBO et SFO). L'étude de l'effet des EsO sur ces huiles végétales implique l'investigation de l'effet sur leur cristallisation.

Les huiles végétales utilisées dans le cadre de cette investigation ont été achetées dans un marché local aux Etats-Unis (Logan, UT, USA). Les huiles de soja (SBO) et de tournesol (SFO) proviennent de Kroger (Ohio, USA) alors que l'huile de palme (PO) provient de l'entreprise ADM (Illinois, USA). Un mélange de PO, SBO et SFO a été préparé dans les proportions 2:1:1, m/m/m respectivement, afin de reproduire les proportions usitées pour formuler les émulsions étudiées. Des échantillons de PO en mélange ou non avec les huiles végétales précédentes (Mix), contenant 5% (m/m) de chacune des EsO de *P. scoparius* (tiges et fleurs) ont été préparés par addition de 50 mg des EsO dans 1 g des huiles végétales correspondantes (préalablement chauffées par microonde pendant 2 min pour permettre leur fusion complète). Ces EsO ont été mélangées et homogénéisées avec les huiles végétales, en remuant délicatement avec une spatule. Un total de 6 échantillons ont été préparés: (i) PO sans EsO, (ii) PO avec addition de 5% de EsOF, (iii) PO avec addition de 5% de EsOS, (iv) Mix sans EsO, (v) Mix avec addition de 5% de EsOF et (vi) Mix avec addition de 5% de EsOS.

### **6.1. Evaluation du point de fusion**

Les points de fusion des échantillons étudiés ont été déterminés par la méthode du tube capillaire selon la méthode officielle de l'AOCs Cc 1-25. Des tubes capillaires contenant les échantillons de corps gras (incorporés ou non des EsO) ont été placés à -20 °C durant la nuit. Ensuite, les tubes sont sortis du congélateur et essuyés à leur base par du papier fin. Ils sont fixés à un thermomètre, submergés dans un béccher rempli d'eau froide et chauffés sous agitation continue (vitesse de chauffage de 0,5 °C/min). Le point de fusion correspond à la température à laquelle le corps gras, formant une colonne à l'intérieur du tube capillaire, commence à monter

en raison de la pression hydrostatique (ramollissement de la matière grasse à l'intérieur du tube capillaire sous l'effet de l'augmentation de la température). Au moment où la colonne du corps gras commence à monter à l'intérieur du tube capillaire, la température s'affichant sur l'écran du thermocouple est prise comme étant le point de fusion. Un minimum de trois tubes capillaires est préparé pour le même échantillon à chaque fois. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type standard.

## **6.2. Analyse thermique par calorimétrie différentielle à balayage**

Le comportement à la fusion et à la cristallisation des échantillons étudiés ont été évalués par DSC en mode isotherme sur un calorimètre Q20 DSC doté d'un système de refroidissement RCS (TA instruments, New Castle, DE, USA). La ligne de base et la température en DSC ont été calibrées avec un étalon en indium pur. Un creuset en aluminium scellé et vide a été utilisé comme référence. Les échantillons ont été pesés (10-15 mg) dans des creusets en aluminium hermétique Tzero (TA instruments), ensuite couverts et scellés avec des couvercles en aluminium et sertis sous presse. La procédure de cristallisation en mode isotherme a consisté à chauffer les échantillons à 60 °C et à les maintenir ainsi pendant 15 min (assurer une fusion complète et effacer toute mémoire cristalline de l'échantillon). Le système a ensuite été refroidi de 60 °C aux températures de cristallisation ( $T_c$ ) de 20, 21, 22, 23, et 24 °C, cas des échantillons de PO, PO + 5% EsOF, PO + 5% EsOS, et 10, 13, 15, 17, et 20 °C, cas des échantillons de Mix, Mix + 5% EsOF et Mix + 5% EsOS à une vitesse de température de programmation de 5 °C/min. Les échantillons ont été maintenus à leurs  $T_c$  respectives pendant 60 min, puis chauffés à une vitesse de température de 5 °C/min pour obtenir des endothermes de fusion des échantillons précédemment cristallisés. Les propriétés et paramètres de cristallisation et de fusion ont été calculés à par le logiciel d'analyse TA Universal Analysis. Les paramètres de cristallisation incluent le temps de début de cristallisation ( $t_{on}$ ), le temps de pic de cristallisation ( $t_c$ ) et l'enthalpie de cristallisation ( $\Delta H_c$ ). Quant aux paramètres de fusion, ils comprennent la température de début de fusion ( $T_{on}$ ), la température de pic de fusion ( $T_p$ ) et l'enthalpie de fusion ( $\Delta H_m$ ). Le temps zéro pour les paramètres  $t_{on}$  et  $T_c$  correspond au temps pour lequel l'échantillon atteint la température de cristallisation. Par conséquent, ces paramètres ont été calculés sur la base de la différence entre le temps nécessaire pour atteindre le début ou le pic de cristallisation et le temps nécessaire pour atteindre la température de cristallisation. Les températures de cristallisation ont été choisies pour obtenir un temps d'induction de cristallisation entre zéro et 60 min.

### **6.3. Détermination du taux de solide (SFC)**

Le taux de solide des échantillons étudiés (SFC) a été évalué par résonance magnétique nucléaire pulsée à basse résolution (RMN-p) ou p-NMR (pour pulsed nuclear magnetic resonance) à l'aide d'un spectromètre RMN Minispec MQ 20 (Bruker, Allemagne). Les échantillons ont été portés à fusion dans une étuve à 60 °C, puis homogénéisés en remuant les échantillons avec une tige en verre. Les échantillons sont mis à l'intérieur des tubes RMN à hauteur de 5 cm, à l'aide d'une pipette Pasteur (l'étiquetage des échantillons est réalisé sur les bouchons des tubes et non sur leurs surfaces). Ensuite, Les tubes RMN contenant les échantillons étudiés (4 tubes RMN pour chaque échantillon) ont été placés dans un bain Marie ( $t = 0$  ; temps de la première introduction des quatre tubes RMN simultanément dans le bain Marie) et maintenus aux températures de cristallisation correspondantes ( $T_c$ ) pour une durée de 60 min. Les SFC ont été mesurés à partir de  $t = 0$  en fonction du temps, en utilisant les quatre tubes RMN mesurés séquentiellement et immédiatement remis dans le bain d'eau après chaque mesure réalisée. Les valeurs SFC ont été mesurées toutes les 2 min pendant 60 min. Les mesures faites sur les échantillons étudiés ont été effectuées en triplicat et les valeurs moyennes ont fait l'objet d'un ajustement (fitting) en appliquant le modèle d'Avrami:

$$SFC = SFC_m (1 - e^{-k_n \times t^n})$$

Où :  $t$  est le temps,  $k_n$  est la constante de vitesse,  $SFC_m$  est le SFC maximal obtenu lorsque l'échantillon atteint l'équilibre, et  $n$  représente l'indice de la réaction.

### **6.4. Analyse de la morphologie cristalline**

La microstructure des cristaux obtenus pour les échantillons étudiés a été observée à l'aide d'un microscope à lumière polarisée (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) équipé d'un appareil de photographie numérique et d'un logiciel de capture des images (Lumenera Infinity 2, Lumenera Corp., Nepean, Canada). Une quantité minime de l'échantillon est chauffée au préalable par microondes pendant 2 min. Celle-ci est ensuite homogénéisée en remuant avec une spatule. Une goutte minuscule de l'échantillon est déposée sur la lame en verre et recouverte d'une lamelle. Une procédure isotherme, semblable à celle utilisée en DSC, est appliquée pour tous les échantillons (PO et Mix, avec et sans EsO). Un grossissement de 10X est utilisé. L'analyse cristalline des échantillons est réalisée à l'aide du logiciel image J (Version 1,43, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Un triplicat d'images a été effectué pour les échantillons étudiés et trois paramètres ont été évalués: la circularité (C), la

surface totale (TA) et le diamètre minimum (MinD) rapportés soit comme moyenne  $\pm$  SD (C) ou moyenne  $\pm$  SE (TA et MinD).

La taille des cristaux a été aussi évaluée en utilisant un logiciel plus performant (Image-Pro Premier) (version 9.2.22, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Un triplicat d'images a été traité dans chaque cas et la taille des cristaux a été analysée par le calcul du rayon ( $\mu\text{m}$ ) exprimé en moyenne  $\pm$  écart-type standard.

## **7. Evaluation sensorielle des émulsions**

L'évaluation sensorielle a été effectuée par la procédure décrite par Chikhouné *et al.* (2014). Les sujets (31 dégustateurs) sont constitués principalement par le personnel de l'entreprise agroalimentaire CEVITAL SPA (Béjaia, Algérie). Quatre émulsions ont été préparées codées de 1 à 4: émulsion A (émulsion témoin), émulsion B (émulsion contenant 100 ppm de l'EsO), émulsion C (émulsion contenant 300 ppm de l'EsO) et émulsion D (émulsion contenant 600 ppm de l'EsO). Celles-ci ont été présentées simultanément aux sujets avec des tranches de pommes pour enlever le goût de la précédente dégustation. Un test hédonique a été effectué pour caractériser les émulsions en termes de dix attributs: tartinabilité, crémeux, doux, fondant en bouche, aspect, texture, saveur de beurre, saveur de margarine, salé et arrière-goût.

## **8. Analyse statistique**

Pour l'ensemble des tests spectrophotométriques, les composés analysés et les paramètres rapportés sont évalués en triplicat. L'analyse statistique des données a été réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) et le test LSD (least significant difference) par le logiciel STATISTICA 5.5 et STATISTICA 7.0 (StatSoft, Tulsa, USA) pour montrer les mesures qui peuvent être considérées statistiquement différentes à un seuil de signification de 5% ( $p < 0,05$ ). Les données de la composition des EsOF et EsOS ont été exprimées en moyennes  $\pm$  écart-types standards, sur la base d'un duplicat d'analyses. Les échantillons ont été considérés comme étant des variables indépendantes et un test de Student (t-test) par paires (STATISTICA 7.0) a été utilisé ( $p < 0,05$ ) pour chaque composé détecté dans les EsO. Les autres mesures ont été effectuées par l'analyse de la variance (ANOVA) et le test *post-hoc* LSD par le logiciel STATISTICA 7.0, pour montrer les mesures qui peuvent être considérées statistiquement différentes à un seuil de signification de 5% ( $p < 0,05$ ). L'analyse statistique des données de l'évaluation sensorielle ont été réalisées par analyse en composantes principales (ACP) à l'aide du logiciel XLSTAT 7.5 (Addinosoft, France). Les graphiques dans la présente thèse sont réalisés à l'aide du logiciel OriginPro 9 (Version 90E, Northampton, Massachusetts, USA) et

Adobe Photoshop CS2 version 9,0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). Les images PLM ont été traitées par deux logiciels : le logiciel image J (version 1.43, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) et le logiciel Image-Pro Premier (version 9.2.22, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Les structures chimiques des composés ont été dessinées à l'aide du logiciel ACD/ChemSketch 2015 2.5 (ACD/Labs, Ontario, Canada).

# Résultats

# Stabilité oxydative

Effet de l'huile essentielle de *P. scoparius* dans une émulsion formulée à l'échelle laboratoire



## Introduction

La propriété des lipides à se trouver sous formes émulsifiées introduit le concept de l'instabilité oxydative, rendant ainsi les aliments sensibles à l'oxydation des lipides (Adachi *et al.*, 2009). Cette dernière est un problème majeur aussi bien pour les consommateurs que pour les industries agroalimentaires, puisqu'elle affecte plusieurs aspects de la matrice alimentaire dont la flaveur, la texture, la durée de vie et la qualité nutritionnelle du produit fini (Kiokias *et al.*, 2006 ; Ponginebbi *et al.*, 1999). L'oxydation à l'interface constitue un des grands soucis de l'industrie alimentaire, étant donné qu'elle affecte la stabilité d'un grand nombre d'aliments existants sous formes d'émulsions (Calligaris *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont confirmé à l'heure actuelle que les antioxydants exogènes sont essentiels pour contrecarrer le stress oxydatif, notamment ceux rencontrés dans les huiles essentielles. Ces mélanges complexes de plusieurs composés probablement influencés par les interactions entre les différents composés qui les constituent. Ceci est le plus généralement dû à l'action additive et/ou un effet synergique entre les différentes classes chimiques de ces composés (Nenaah, 2014). La conscientisation des consommateurs a pris de l'ampleur dernièrement quant aux additifs de synthèse chimique. De ce fait, les additifs d'origine naturelle utilisés à des fins alimentaires pour la conservation des aliments devient de plus en plus en vogue (Holley et Patel, 2005). En effet, la demande par rapport à des produits alimentaires plus sains a encouragé la communauté scientifique à explorer de nouvelles techniques de conservation de haute efficacité. Afin de réduire l'ampleur de l'oxydation des lipides, l'addition directe des antioxydants naturels a été appliquée parmi les stratégies de la conservation des aliments (Gomez Estaca *et al.*, 2014).

Le genre *Pituranthos* possède plus de 20 espèces, dont certaines sont spécifiques à l'Afrique du nord et très souvent localisées dans les régions arides ou désertiques (Nègre, 1961). De ce fait, *P. scoparius* est dite endémique à l'Afrique du nord et est répondue en Algérie, plus particulièrement dans les hauts plateaux et la plupart des régions du Sahara. L'usage traditionnel en médecine traditionnelle concerne son application en cataplasmes sur la tête pour les maux de tête (Bellakhdar, 1997). Boutaghane *et al.* (2004) ont rapporté une activité antibactérienne pour les graines et les tiges de *P. scoparius*. Les travaux visant à établir le profil chimique des huiles essentielles de *P. scoparius* sont très limités. Nous citons ici principalement le travail de Vérité *et al.* (2004) sur les tiges et les graines de *P. scoparius*, leurs activités antibactériennes (Boutaghane *et al.*, 2004), et plus récemment le travail de Lograda *et al.* (2013) sur la variation

de leurs compositions, récoltées dans différentes régions semi-arides et hauts plateaux en Algérie.

L'objectif principal de cette investigation est l'étude de l'incorporation de l'huile essentielle de *P. scoparius* dans une émulsion eau dans l'huile (W/O) de type matière grasse tartinable (spread) à base de lactosérum. Deux objectifs secondaires sont visés : la valorisation du lactosérum issu d'une fromagerie locale (SAFILAIT SPA, Constantine) et la valorisation de la plante *P. scoparius* à travers son contenu en huile essentielle dans une formulation alimentaire. Une caractérisation chromatographique exhaustive a été menée sur l'huile essentielle pour établir son profil phytochimique. Les conditions chromatographiques suivies ont été soigneusement fixées après plusieurs essais au laboratoire. La chromatographie TLC/HPTLC combinée avec l'usage du DPPH• permet d'évaluer qualitativement les fractions les plus actives dans les huiles essentielles. Pour rendre compte d'un possible effet de séchage de la plante sur la composition terpénique, les huiles essentielles à partir de la plante sèche (DP) et de la plante fraîche (FP) ont été caractérisées. L'incorporation de l'huile essentielle dans l'émulsion à l'échelle laboratoire a pour objectif d'étudier la stabilité oxydative de celle-ci, sous des conditions d'oxydation drastiques. En effet, un test d'accélération de l'oxydation à l'aide du Rancimat fournit une idée sur la capacité de protection des antioxydants vis-à-vis de l'oxydation accélérée. Enfin, une évaluation sensorielle de l'effet de l'incorporation de l'huile essentielle ; à différentes concentrations progressives (100, 300 et 600 ppm), est réalisée pour rendre compte de l'impact de cette addition sur le dégustateur. Un layout général de l'étude réalisée et des principaux résultats est présenté en Figure 29.

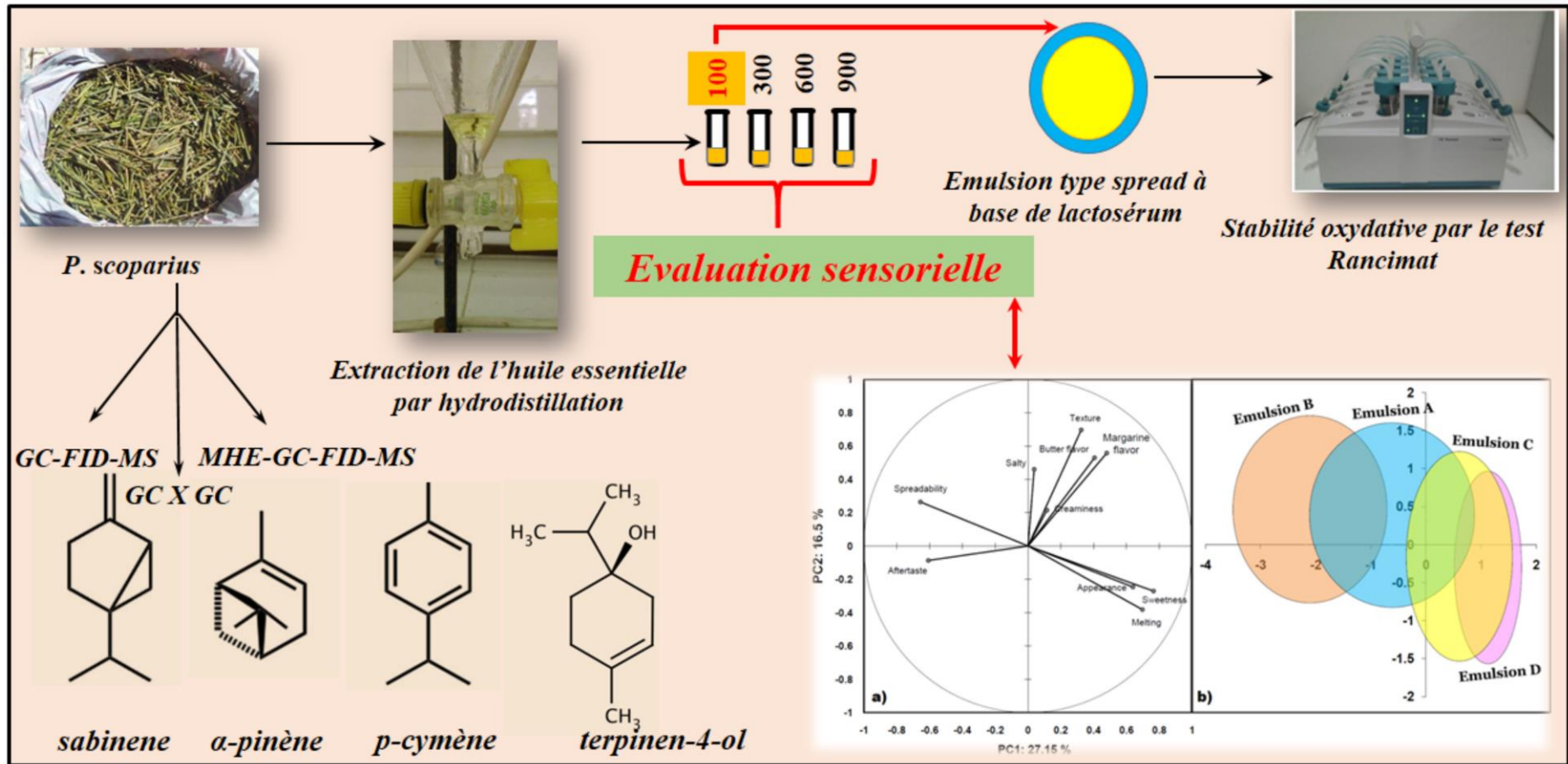


Figure 29 : layout général de la démarche expérimentale et des résultats obtenus (Publication n°1).

---

**Publication n° 01**

**Antioxidant effect induced by the essential oil of *Pituranthos scoparius* in a formulation of a whey spread emulsion**

Chikhouné A., Pavlica J.D., Shashkov M., Berroua Z., Chebbi K., Bougherra H., Zeroual B., Aliane K., Gagaoua M., Boudjellal A., Vovk I. et Križman M.

Publié dans *Journal of Food Processing and Preservation* (2017) e13163, 1 - 12

---

**Résumé**

Cette étude a été réalisée dans le cadre de la valorisation de l'huile essentielle, extraite à partir de *Pituranthos scoparius* par le procédé d'hydrodistillation pour une éventuelle application industrielle. Diverses techniques chromatographiques ont été utilisées dont la chromatographie sur couche mince/haute performance (TLC/HPTLC), extraction multiple en espace de tête couplée à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse (MHE-GC-FID-MS), chromatographie gazeuse à deux dimensions (GCxGC) et la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse avec détection par ionisation de flamme (GC-FID-MS). Celles-ci ont permis la caractérisation, l'identification et la quantification de 48 composés, divisés en trois groupes terpéniques majeurs : les monoterpènes, les diterpènes et les composés oxygénés, les monoterpènes étant les composés majoritaires. Les huiles essentielles de la plante sèche (DP) et de la plante fraîche (FP) ont montré une activité antioxydante, exprimée par une activité de piégeage (scavenging) radicalaire et démontrée par la méthode TLC-DPPH<sup>•</sup>. Le test de formulation de l'émulsion type spread à base de lactosérum à l'échelle laboratoire a montré une protection contre l'oxydation des lipides, la stabilité oxydative induite a été de 20,82 h. L'évaluation sensorielle du spread incorporé à 100, 300 et 600 ppm de l'huile essentielle de *P. scoparius*, avec une analyse statistique en composantes principales (ACP) a révélée l'influence de certains attributs sensoriels sur la ségrégation des émulsions incorporés des différentes concentrations. Les données obtenues à l'issue de cette étude suggèrent que l'huile essentielle de *P. scoparius* peut constituer un candidat potentiel et prometteur comme bioconservateur et ce à l'échelle industrielle.

---

**Mots clés :** *Pituranthos scoparius* ; huiles essentielles ; émulsion; monoterpènes ; activité antioxydante ; stabilité oxydative ; bioconservateur.

# Antioxidant effect induced by the essential oil of *Pituranthos scoparius* in a formulation of a whey spread emulsion

Anis Chikhoun<sup>1</sup> | Jan Damjan Pavleca<sup>2</sup> | Mikhail Shashkov<sup>3,4</sup> | Zahra Berroua<sup>5</sup> |  
Kaissa Chebbi<sup>5</sup> | Hind Bougherra<sup>6</sup> | Brahim Zeroual<sup>7</sup> | Khellaf Aliane<sup>7</sup> |  
Mohammed Gagaoua<sup>1</sup> | Abdelghani Boudjellal<sup>1</sup> | Irena Vovk<sup>2</sup> | Mitja Krizman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Equipe Maquav, Laboratoire BIOQUAL, I.N. A.T.A.A, Université Frères Mentouri Constantine, Route de Ain El-Bey, Constantine 25000, Algérie

<sup>2</sup>Laboratory for Food Chemistry, National Institute of Chemistry, Hajdrihova 19, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>3</sup>Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Pr. Lavrentyeva. 5, Novosibirsk 630090, Russian Federation

<sup>4</sup>Novosibirsk state University, 630090, Pyrogova st, 2, Novosibirsk 630090, Russian Federation

<sup>5</sup>Département des Technologies Alimentaires, I.N.A.T.A.A, Université Frères Mentouri Constantine, Route de Ain El-Bey, Constantine 2500, Algérie

<sup>6</sup>Département de Génie des Procédés, Université Abderrahmane Mira, Laboratoire des Matériaux Organiques, Bejaia 06000, Algérie

<sup>7</sup>Cévitall spa, nouveau quai, port de Bejaia, BP 334, Bejaia 06000, Algeria

## Correspondence

Dr. Anis Chikhoun, Equipe Maquav, Laboratoire BIOQUAL, I.N.A.T.A.A, Université Frères Mentouri Constantine, Route de Ain El-Bey 25000 Constantine, Algeria.  
Email: anis.chikhoun@gmail.com

## Funding information

INATAA, University of Brothers Mentouri Constantine

## Abstract

This study falls within the framework of industrial exploitation of the essential oil recovered from *Pituranthos scoparius*. Chromatographic techniques, namely TLC, HPTLC, MHE-GC-FID-MS, GC X GC, and GC-FID-MS have been used for the characterization, identification and quantification of 48 compounds, divided into three major terpene groups: monoterpenes, diterpenes, and oxygenated compounds. The essential oil displayed an antioxidant activity, presented by a radical scavenging activity and evaluated by the TLC-DPPH\* method. Tests conducted at laboratory scale showed high protection from lipid oxidation of the spread emulsion, with an oxidative stability of 20.82 h. A sensory evaluation was carried out on emulsions incorporated with the essential oil. The PCA analysis revealed the effect of some attributes on the segregation between the four emulsions formulated. These data suggest that the essential oil of *Pituranthos scoparius* is a possible and promising candidate as a biopreservative at an industrial scale for food preservation.

## Practical applications

Essential oil of *Pituranthos scoparius* is traditionally used in folk medicine as a remedy for several illnesses. Its antibacterial properties are also exploited in the preservation of traditional cheese making. Whey is a by-product of cheese and casein industries, still considered as a waste. Valorization of this by-product in a whey spread emulsion is considered in the present work. Due to the bioactive compounds contained in the essential oil (such as terpinen-4-ol), the essential oil exhibits high antioxidant activity. As oxidation phenomena becomes a topical issue in fat and oil food industry, natural plants containing essential oils with high antioxidant properties are considered as good alternatives to synthetic antioxidants.

## KEYWORDS

essential oil, monoterpenes, emulsion, oxidative stability

## 1 | INTRODUCTION

The occurrence of lipids in emulsified forms introduces the oxidative instability and foods become sensitive to lipid oxidation (Adachi, Minten, & Kobayashi, 2009). The latter is a main problem for both consumers and food industries since it affects several aspects of the food matrix such as: flavor, texture, shelf life and nutritional quality of the final product (Kiokias, Dimakou, Tsaprouni, & Oreopoulou, 2006;

Ponginebbi, Nawar, & Chinachoti, 1999). Interfacial oxidation is of a great concern to the food industry, as it affects the stability of a large number of foods which exist as emulsions (Calligaris, Manzocco, & Nicoli, 2007). Many studies have now confirmed that exogenic antioxidants are essential for counteracting oxidative stress, especially those found in essential oils. These complex mixtures of several compounds are likely influenced by interactions among their structural components due to additive action and/or synergism between chemical classes

(Nenaah, 2014). Consumer awareness arises recently regarding synthetic chemical additives. Therefore, natural additives used for food preservation become increasingly popular (Holley & Patel, 2005). In fact, the demand for healthier and safer food products has encouraged to explore newer and more efficient preservation techniques. To reduce lipid oxidation, direct addition of natural antioxidants was applied among strategies of food preservation (Gómez-Estaca, López-Dicastillo, Hernández-Muñoz, Catalá, & Gavara, 2014).

Genus *Pituranthos* has more than 20 species, some of which are specific to North Africa and are often found in arid or desert areas (Nègre, 1961). *P. scoparius* is an endemic plant of North Africa and is widespread in Algeria, especially in the high plateau and in most parts of the Sahara. The traditional use of the plant in folk medicine concerns applying it in poultices to the head for headaches (Bellakhdar, 1997). Boutaghane, Nacer, Kabouche, and Ait-Kaki (2004) reported an antibacterial activity for the seeds and stems of *P. scoparius*. Reports of the chemical profile of the essential oils of *P. scoparius* are very limited. We report mainly the work of (Vérité, Nacer, Kabouche, & Seguin, 2004) on stems and seeds of *P. scoparius* (Boutaghane et al., 2004) on their antibacterial activities and more recently the work of (Lograda, Ramdani, Kiram, Chalard, & Figueredo, 2013) on the variation of the essential oils compositions of *P. scoparius* collected from different locations in Algeria.

To the best of our knowledge, this is the very first report on the potential use of *Pituranthos scoparius*' essential oil as a biopreservative in a whey spread-type emulsion. To reach this objective, an elegant approach using chromatography was used; including a fingerprinting of the bioactive compounds by high performance thin layer chromatography (HPTLC) densitometry, evaluation of the relative composition and quantification of volatiles by MHE-GC-FID-MS and an improved GC × GC procedure for the separation of the related compounds. Then, our efforts were focused on the study of oxidative stability of a whey spread emulsion formulation, incorporated with the essential oil and compared to a control one containing  $\alpha$ -Tocopherol. In this context, a Rancimat test was carried out regarding the resistance to oxidation of the emulsions produced at a laboratory scale.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Chemicals

Formic acid (98–100%), n-hexane ( $\geq 99\%$ ) and isooctane were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), ethylacetate (99.5%) from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and methanol (99.9%) of HPLC grade from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Bidistilled water (conductivity =  $18.2 \mu\text{s cm}^{-1}$ ) was used. Sulfuric acid (95–97%) and 4-methoxybenzaldehyde (anisaldehyde) were from Merck (Darmstadt, Germany), DPPH\* (2,2-diphenyl-b-picrylhydrazyl) was from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Standards of carvone ( $\geq 99\%$ ), p-cymene (95%), limonene ( $\geq 98\%$ ),  $\alpha$ -phellandrene ( $\geq 99\%$ ),  $\alpha$ -pinene ( $\geq 99\%$ ),  $\beta$ -pinene ( $\geq 99\%$ )  $\alpha$ -terpinen (85–90%), and  $\gamma$ -terpinen were from Fluka (Seelze, Germany), thymol from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Standards of gallic acid ( $\geq 99\%$ ), Quercetin ( $\geq 98\%$ ), Ascorbic acid ( $\geq 99\%$ ) were

obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Folin-Ciocalteu reagent from Merck (Darmstadt, Germany) and the remaining reagents and solvents were of analytical grade.

For whey spread emulsion formulation, refined, bleached and deodorized oils, palm oil (PO), sunflower oil (SFO) and soybean oil (SBO) are obtained from a local refinery (CEVITAL SPA). Other ingredients included emulsifier (mono lactic acid) purchased from (Palsgaard, Denmark), a colorant: Anatto Curcumin OSS 3525 (Global Entreprise, Switzerland), filtered water, pasteurized liquid whey (generously donated by SAFILAIT food industry from cheese-making process) and vacuum-dried salt.

### 2.2 | Preparation of standard solutions

Working standard solutions of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -terpinen,  $\alpha$ -phellandrene, and p-cymene were prepared in ethylacetate to a concentration of  $0.1 \text{ mL}/0.2 \text{ mL}^{-1}$  in pure ethylacetate for HPTLC analysis.

For HS-GC-FID analysis, standard solution of  $\beta$ -pinene, limonene and *trans*-anethole was prepared in methanol at a concentration of  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ , each. Ten microliters of the standard solution were put into 20 mL HS vial plus 20 mL of water.

### 2.3 | Preparation of spraying and dipping reagents

Anisaldehyde detection reagent was prepared by mixing glacial acetic acid (20 mL) and methanol (170 mL); the mixture was cooled in an ice bath and sulfuric acid (16 mL), and 4-methoxybenzaldehyde (1 mL) were added in a dropwise manner.

DPPH\* (2,2-diphenyl-b-picrylhydrazyl) was prepared by dissolving 0.2 g of the reagent in 100 mL of pure methanol, so as to have a solution of 0.2% (m/v).

### 2.4 | Extraction of essential oil

Aerial parts (stems and leaves) of *Pituranthos scoparius* were collected from Sedrata, Souk Ahras situated in the northeast of Algeria. The samples were collected in April 2014. A part of the plant aerial material was used as freshly collected for MHE-GC-FID-MS analysis; the other part was dried at room temperature in laboratory and cut in small pieces. An amount of 150 g of the latter was subjected to hydrodistillation for 4 h 30 on a Clevenger type apparatus to isolate the essential oil. Two types of essential oil were obtained; namely, fresh plant (FP) and dried plant (DP) according to the drying process of the material plant: a yellowish-transparent essential oil corresponding to the fresh plant dried for 48 h and a yellowish-intense essential oil dried for approximately 1 month, at laboratory and at room temperature. The essential oils, obtained after the hydrodistillation process, were of a characteristic odor. They were allowed to be separated from the aqueous phase in a glass tube, then carefully and gently collected by a syringe and filtered through a  $0.45 \mu\text{m}$  Millipore Millex-HV hydrophilic poly(vinylidene difluoride)-PVDF membrane filter (Billerica, MA), then stored in ambered vials of 1.5 mL, protected from light at  $4^\circ\text{C}$  until use.

## 2.5 | Thin layer chromatography (TLC) and high performance thin layer chromatography (HPTLC)-densitometry analyses

The essential oil was diluted to 1:30 (1 + 29, v/v). For TLC screening of terpenes, TLC silica gel 60 plate 5 cm × 10 cm (Merck, Darmstadt, Germany) (Art. No. 1. 05553) was used. The plate was developed in twin-trough chamber (CAMAG, Muttenz, Switzerland). Five microliters of the working sample solution were applied in the form of 5 mm bands, at 8 mm from the bottom, and 15 mm from the left edge of the plate (the space between two bands was set to 10 mm) with a Camag microliter syringe (25  $\mu$ L syringe size) using an ATS4 autosampler (CAMAG) on to the TLC plate, 1 cm from the bottom edge. The plate was first developed in isoctane throughout 8 cm length. The second development was done to 5 cm height with n-hexane-ethyl acetate (5 + 1, v/v). For both developments, 10 mL of the developing system was used without any preconditioning. After development, the plate was dried under warm stream before derivatization step. Postchromatographic derivatization was performed by respectively heating the plate at 110°C for 3 min on a TLC plate heater (CAMAG), then spraying for 1 min the plate with anisaldehyde detection reagent. Documentation of the chromatographic plate was performed by DigiStore 2 Documentation System (CAMAG) operated with winCATS Version 1.4.1.8154 software. For the HPTLC procedure, a HPTLC F<sub>254</sub> silica gel 60 plate 10 cm × 10 cm (Merck, Darmstadt, Germany) (Art. No. 1. 05629) was developed and derivatized as previously, along with 10  $\mu$ L of the working standard solutions then scanned at  $\lambda = 500$  nm with a TLC scanner III (CAMAG), the slit dimension was kept at 3.00 mm × 0.30 mm with a scanning speed of 20 mm s<sup>-1</sup> and a data resolution of 100  $\mu$ m step<sup>-1</sup>.

## 3 | ANALYSIS OF VOLATILES BY MULTIPLE HEADSPACE EXTRACTION (MHE)-GAS CHROMATOGRAPHY (GC)-FLAME IONIZATION DETECTOR (FID)-MASS SPECTROMETRY (MS)

### 3.1 | Instrumentation

MHS-GC-FID analyses were performed on a Focus GC (Thermo) coupled to a HS 40 XL (Perkin Elmer) headspace autosampler. GC-MS identification was done on a Trace Ultra GC coupled to a DSQ II single-quad mass spectrometer (Thermo). MHE and GC-FID conditions were the following: carrier gas (He), oven temperature (145°C), needle temperature (265°C), transfer temperature (190°C), pressurization (270 kPa), thermostat time (35 min), pressurization time (0.6 min), and injection time (0.04 min). MHE injections (3), flow mode (2.0 mL min<sup>-1</sup>, constant flow), split ratio (1:25), inlet temperature (280°C), FID temperature (280°C), GC column: ZB-5MSi, 30 m × 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m film (Phenomenex), oven temperature program: 50°C (0.5 min) to 105°C at 15°C min<sup>-1</sup> to 180°C at 30°C min to 250°C at 10°C/min (1 min).

### 3.2 | Analysis and quantification

GC-MS identification of volatile compounds was performed by injecting solutions of 1% (v/v) *Pituranthos* essential oil in ethyl acetate. Plant

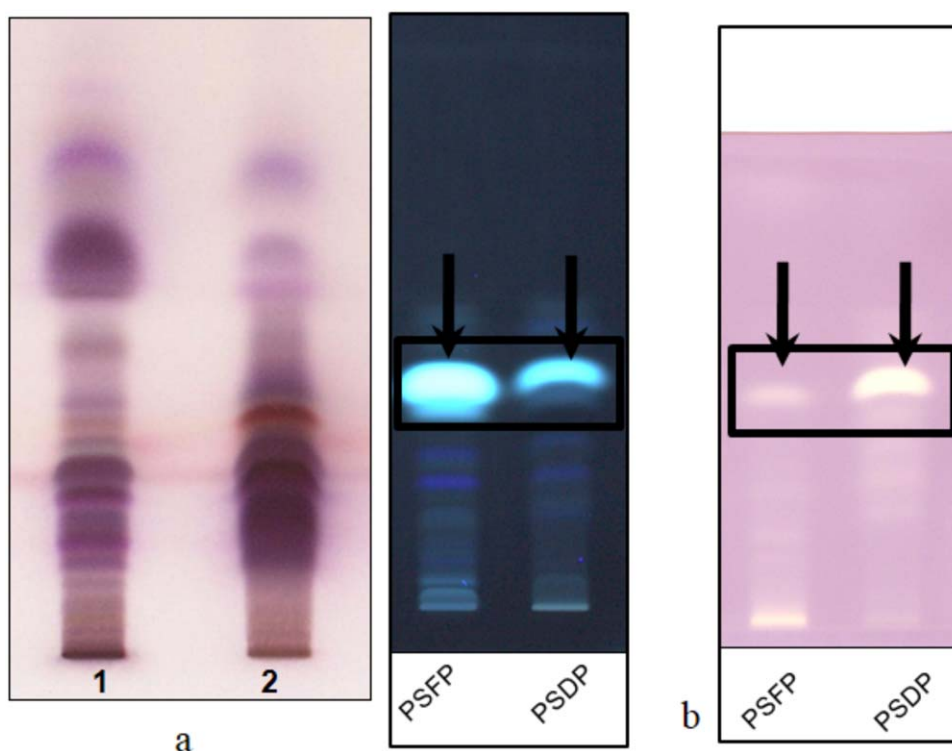
samples were first dried at 50–60°C, and then homogenized with a dismembrator to obtain a fine powder. Twenty milligrams of homogenized sample were put into a HS vial with the addition of 20 mL of water and 10  $\mu$ L of methanol. MHE-GC analysis was performed by three sequential HS injections from standard and sample vials. Chromatographic peaks were classified into three peak groups, namely monoterpenes, diterpenes, and oxygenated compounds—the latter including all aromatic compounds, terpene alcohols, etc. Monoterpene and diterpene peak groups were quantified by means of  $\beta$ -pinene and limonene standards while the oxygenated compound group was quantified by means of *trans*-anethole standard. GC-MS conditions were the following: carrier gas (He), flow mode (1.0 mL min<sup>-1</sup>, constant flow), split ratio (1:25), inlet temperature (280°C), injection volume (0.5  $\mu$ L), transfer line temperature (280°C). MS source temperature (200°C), ionization energy (+70 eV), scan range (40–250 m/z), GC column J&W: ZB-5HT, 20 m × 0.18 mm, 0.18  $\mu$ m film, oven temperature program: 50°C (0.5 min) to 105°C at 15°C min<sup>-1</sup> to 180°C at 30°C min<sup>-1</sup> to 250°C at 10°C min<sup>-1</sup> (1 min).

### 3.3 | GC-MS analysis of the hydrodistilled essential oil

GC-MS identification was performed by injecting solutions of 1% (v/v) *Pituranthos* essential oil in hexane. Standard solutions of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -phellandrene,  $\alpha$ -terpinene, p-cymene, limonene,  $\gamma$ -terpinene, and carvone were prepared in hexane, at a concentration of 200 ppm. Thermo Trace GC Ultra gas chromatograph equipped with a ZB-5HT fused silica capillary column (20 m × 0.18 mm × 0.18  $\mu$ m) was interfaced to a Thermo DSQ II mass spectrometer. Temperature was programmed from 50°C (1 min) to 150°C at 3°C min<sup>-1</sup> and then at a rate of 5°C min<sup>-1</sup> till 260°C, with a 1 min hold. Helium was used as a carrier gas (0.6 mL min<sup>-1</sup>); injection was in split mode (1:25); with injector temperature 280°C. The mass spectrometer worked in EI mode at 70 eV. The identification of components was based on computer matching of their mass spectra with those of NIST mass spectral library (NIST MS Search 2.0, 2005) as well as on comparison of their retention indices with indices from NIST database. Retention indices were calculated with Van den Dool and Kratz formula. Column and method was transferred to Thermo Focus GC with flame ionization detector for quantitative determination.

### 3.4 | GC × GC analysis of the essential oil

GC × GC analysis was performed using a 2D-chromatography system Agilent 7890N, equipped with flow modulator. The detector used was FID at 250°C. Oven temperature program was 70°C (2 min)—7°C min<sup>-1</sup>—240°C (15 min). The inlet temperature was 250°C. The two dimensional column set was composed of an ionic liquid custom column (4MPyC6, 30 m × 0.25 mm × 0.2 m km; referred to as column 1) and a HP-5 (5 m × 0.25 mm × 0.2 m km, referred to as column 2). High purity helium was used as the carrier gas. The sample was injected using a 1:100 split mode. The flow velocities for column 1 and column 2 were respectively 1 and 25 mL min<sup>-1</sup>, with a modulation time of 1.4 s.



**FIGURE 1** (a) TLC silica gel 60 plate developed in unsaturated twin-trough developing chamber using developing solvents isooctane (first development); n-hexane-ethyl acetate (5:1 v/v) (second development) after derivatization with anisaldehyde detection reagent; white light illumination (vis r). Tracks: 1 = FP; 2 = DP, (b) TLC silica gel 60 plate developed in unsaturated twin-trough developing chamber using developing solvents isooctane (first development); n-hexane-ethyl acetate (5:1 v/v) (second development), under 366 nm illumination before dipping in DPPH\* (left) and after dipping (right) under remission light illumination. The rectangle and the arrows show the most active fractions in FP and DP essential oil of *P. scoparius* (PSFP: *P. scoparius* fresh plant; PSDP: *P. scoparius* dried plant)

### 3.5 | Antioxidant activity by the TLC-DPPH\* dipping method

Fresh solution of DPPH\* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was prepared by dissolving 0.2 g of the reagent in 100 mL of pure methanol, so as to have a solution of 0.2% (m/v), according to (Cieśla, Kryszewski, Stochmal, Oleszek, & Waksmundzka-Hajnos, 2012). TLC silica gel 60 plates without F 5 cm × 10 cm (Merck, Germany) (Art. No. 1. 05553) were developed following the TLC procedure described above, then immersed for 5 s using chromatogram immersion device III (CAMAG). The plate was photographed, protected from daylight by covering the immersion device with an aluminum foil, in 30 min after staining. The experiment was performed in an ambient temperature.

### 3.6 | Preparation of the emulsion

The whey spread emulsion formulated presented the global composition as following:

- 82% fatty phase;
- 16% aqueous phase;
- 2% additives.

The formulation was performed at a laboratory scale. The fatty phase contains a blend of three oils: palm oil (PO), sunflower oil (SFO), and soy-

bean oil (SBO). Besides, amounts of fat soluble ingredients and the essential oil of *Pituranthos scoparius* were dissolved in a beaker and added to the fat blend. The aqueous phase contained pasteurized liquid whey, salt, potassium sorbate, citric acid, the colorant (Anatto Curcumin OSS 3525). These two phases were poured into a stainless steel tank where emulsification occurred with continuous stirring during 20 min, using a stirrer. At this stage, stability of the emulsion is incomplete; a crystallization is needed. This was carried out in a stainless steel tank containing a cold water and ice. Stirring was carried out during the whole process to ensure a homogeneous product. Two emulsions were prepared:

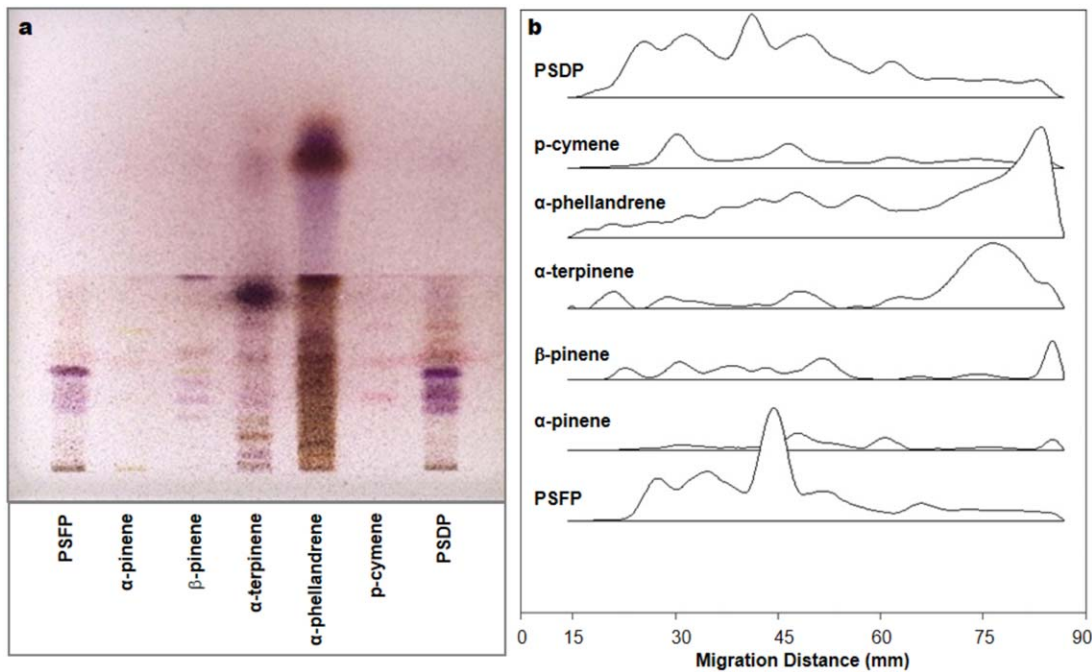
- 1 An emulsion containing the essential oil in the fatty phase as the biopreservative agent (working emulsion);
- 2 An emulsion containing  $\alpha$ -Tocopherol as antioxidant in the fatty phase (control emulsion).

The emulsions produced were packed in sticks of 250 g and stored in a refrigerator at 4°C.

### 3.7 | Oxidative stability

The oxidative stability or the resistance to auto-oxidation of the emulsion incorporated by the essential oil of *P. scoparius* was determined using a Metrom 743 Rancimat (Herisau, Switzerland) per the ISO 6886 method (ISO international standard method, 2006). In this test, a





**FIGURE 2** (a) HPTLC silica gel 60 F254 PLATE, (b) densitograms recorded at 500 nm representing standards of monoterpenes and *P. scoparius* essential oils FP and DP. The developing solvents were isoctane (first development); n-hexane–ethyl acetate (5:1 v/v) (second development) after derivatization with anisaldehyde detection reagent; white light illumination (vis T)

10 L h<sup>-1</sup> stream of dry air is bubbled into 3 g samples maintained at 98°C. Volatile oxidation products are carried through the detector chamber containing deionized water. The change in conductivity is measured and recorded. The increase of the latter is measured as a function of time until maximal change which reflects the IP. The test was carried out until the endpoints of the samples were reached, with a maximum allowable limit of 48 h.

### 3.8 | Sensory evaluation

The sensory evaluation was carried out as recently described by (Chikhouné et al., 2014). Subjects, number of 31 tasters, were staff of an agribusiness food industry (CEVITAL), Algeria. Four spread emulsions were prepared, as previously described, coded from 1 to 4: Emulsion A (control emulsion), Emulsion B (working emulsion containing 100 ppm of the essential oil), Emulsion C (working emulsion containing 300 ppm of the essential oil) and Emulsion D (working emulsion containing 600 ppm). They were presented simultaneously to the subjects together with slices of apples. A hedonic test was performed to characterize the emulsions in terms of ten attributes: spreadability, creaminess, sweetness, melting, appearance, texture, butter flavor, margarine flavor, salty, and aftertaste.

### 3.9 | Statistical analysis

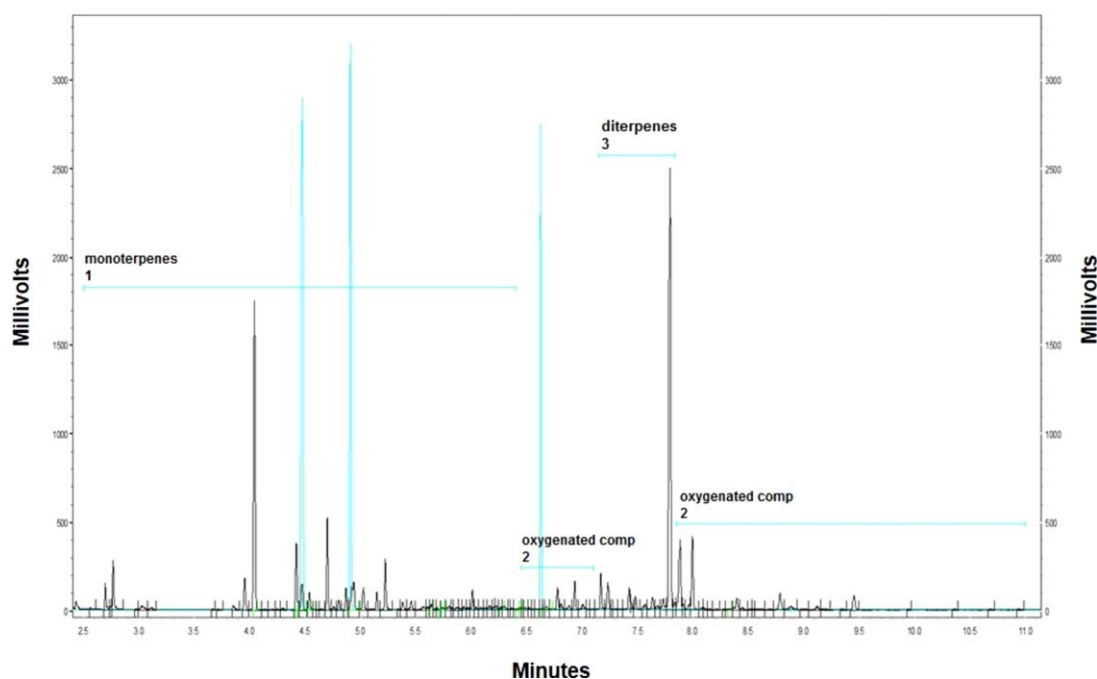
Data of oxidative stability are means ± SD of two measurements. Differences between groups were tested by an analysis of variance (ANOVA) using the STATISTICA software (5.5). The  $\rho$  values ≤ 0.05 were considered significant. Principal component analysis (PCA) on the data of sensory evaluation was performed using XLstat Software 7.5.

## 4 | RESULTS

### 4.1 | Screening of terpenes on TLC and HPTLC densitometry

The screening profile of the hydrodistilled essential oil from the fresh (FP) and dried (DP) plant material, is depicted in Figure 1a. Several bands with different colors and different intensities were revealed using the Anisaldehyde detection reagent. For the application volume used (5 μL) and under the remission visible light (VisR), the essential oils exhibited numerous differences; first, the upper part of (FP) shows a richer region in terms of compounds detected compared to (DP). Bands in this region spread out, probably due to the particle size of the stationary phase precoated on TLC plate, but also the effect of the first developing solvent (isoctane) used. On the contrary, the lower part shows more intense bands for (DP), where shape of the bands is more characteristic and lead to form more pronounced curved structures. According to Pothier, Galand, El Ouali, and Viel (2001), TLC technique is limited because the compounds of essential oils are volatile, so at the top of the plate a diffusion can be observed as an edge effect.

The monoterpenes profiles of the essential oil (Figure 1a), studied following the HPTLC procedure, were scanned by densitometry at 500 nm and the densitograms obtained are presented (Figure 2). The densitograms obtained are not well sharply resolved on the base line, on track 1 FP (fresh plant material) showed peaks matching with the main peaks of standards: p-cymene, β-pinene and α-phellandrene. Whereas on track 7, peaks of DP (dry plant material) are matching more with the main peaks of p-cymene, α-pinene, α-terpinene, and α-phellandrene. This rapid screening of the essential oil (FP and DP) gave an overview of the



**FIGURE 3** Chromatogram of *Pituranthos scoparius* sample with analyte groups indicated. The overlaid is the chromatogram of  $\beta$ -pinene, limonene, and *trans*-anethole standards, respectively

complexity of the plant matrix, due to the several compounds present (Figure 1a), but also the dilemma of their separation (Figure 2).

#### 4.2 | MHE-GC-FID-MS analysis

MHE-GC analysis was performed by three sequential HS injections from standard and sample vials. Chromatographic peaks were classified into three peak groups, namely monoterpenes, diterpenes, and oxygenated compounds; the latter including all aromatic compounds, terpene alcohols, etc. Monoterpene and diterpene peak groups were quantified by means of  $\beta$ -pinene and limonene standards while the oxygenated compound group was quantified by means of *trans*-anethole standard.

The chromatogram of *Pituranthos scoparius* sample is presented (Figure 3). This analysis enabled the identification of 110 peaks. Among them, over 50 peaks can be classified as monoterpenes and about half of that represents the majority of volatile constituents. The oxygenated compound group is mainly composed of terpene alcohols but also some aromatic compounds (e.g., phenylpropanoids). Diterpenes, in contrast, represent only a minor group.

The analytical results from MHE calculations were reported (Table 1). The total volatiles' contents of the three identified groups are in the range (0.203–0.399)%. The correlation coefficients are also given for the three samples analyzed and for every single group of compounds identified. The best correlation coefficients were obtained for sample 3 and are of  $R^2 = 0.9969$  for monoterpenes,  $R^2 = 0.9999$  for diterpenes and  $R^2 = 0.9989$  for oxygenates.

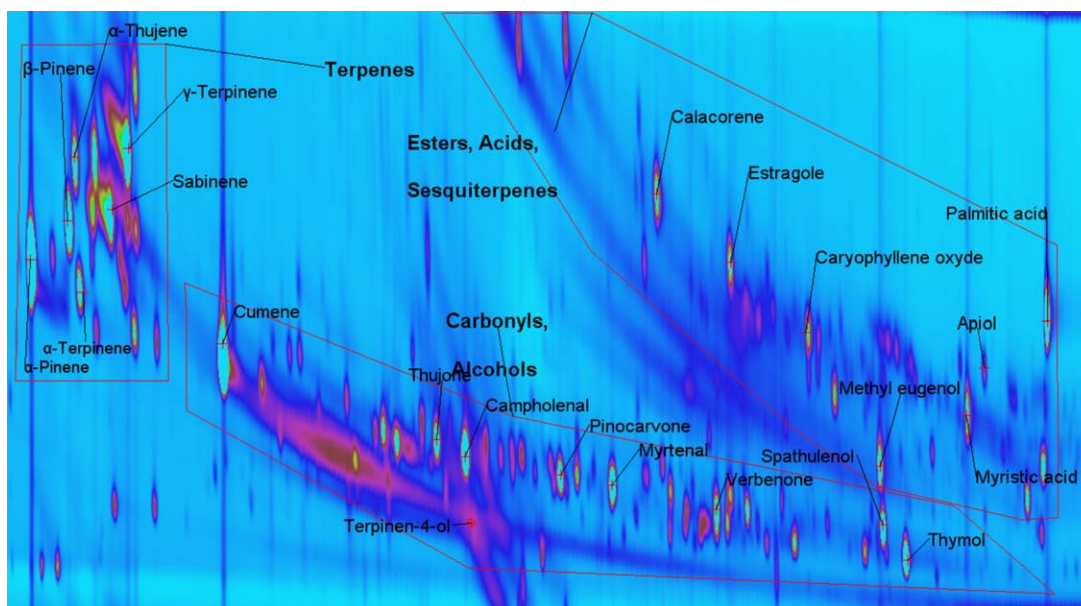
From these results, MHE-GC-FID-MS allowed the characterization and quantitation of the volatiles of *P. scoparius* directly from the plant material and without any pretreatment. A very good linearity of the method was also obtained.

#### 4.3 | GC $\times$ GC analysis

Two-dimensional chromatography is one of the most effective analytical methods for complex multicomponent samples. This is especially true in the case of mixtures containing several compounds with different chemical classes. An example of such complex samples are essential oils, *Pituranthos* in particular. Achieving good separation for

**TABLE 1** Analytical results from MHE calculations. The analysis was performed by three sequential hs injections from standard and sample vials

Analyte group	Sample 1			Sample 2			Sample 3		
	Content (%)	MHE curve slope	MHE curve $R^2$	Content (%)	MHE curve slope	MHE curve $R^2$	Content (%)	MHE curve slope	MHE curve $R^2$
Monoterpenes	0.192	1.5788	0.9963	0.178	1.5506	0.9960	0.134	1.5775	0.9969
Diterpenes	0.028	1.5719	0.9986	0.122	1.3570	0.9967	0.011	1.8130	0.9999
Oxygenates	0.064	1.4120	0.9845	0.099	1.1679	0.9898	0.058	1.4283	0.9989
Total volatiles	0.284			0.399			0.203		



**FIGURE 4** GC  $\times$  GC chromatogram of *Pituranthos scoparius*' essential oil. The red circled zones highlighted the three main groups separated

such samples by traditional GC is most of the time a very difficult task, because it is almost impossible to get the resolution for all peaks of multiple oxygen compounds by one-dimensional GC, while 2D-chromatography offers quite better separation. Therefore, it is necessary in GC  $\times$  GC to use two columns with different selectivity. Moreover, it is common to use high-polar ionic liquid columns in GC  $\times$  GC (Seeley, Seeley, Libby, Breitbach, & Armstrong, 2008). It is worth noting that using ionic liquid columns as the first column achieves more quality and complete separation of complex mixtures (Purcaro, Cordero, Liberto, Bicchi, & Conte, 2014; Seeley et al., 2008). For the separation of *Pituranthos scoparius*' components, it has been suggested to use pyridinium ionic liquids developed by (Shashkov and Sidelnikov, 2013), because this class of stationary phases has shown high-polarity and selectivity for oxygen-containing compounds. As the first column was suggested to use dicationic pyridinium ionic liquid 4MPyC6, the second one was nonpolar siloxane HP-5. By careful selection of the conditions, an improved resolution was achieved (Figure 4). From the latter, certain zones depicted correspond clearly to different chemical classes. Particularly, they can be divided into three groups: group of low-boiling components (monoterpenes), group of the most polar components (carbonyls, alcohols) and group of less polar compounds (sesquiterpenes, high acids, aromatic, and terpene esters). Contour plot peak identification was successfully achieved through information derived from monodimensional GC separation, as reported by GC-MS (Table 2) and MHE-GC-MS (Figure 3). As it can be seen from the red circled zones, the three groups highlighted all fall within specific zones in the bidimensional chromatogram. In addition, the distribution of peaks in the rightmost part of the chromatogram confirms again the need for a 2-D separation. The effectiveness of the 2-D comprehensive GC approach is undoubtedly confirmed for the essential oil of *Pituranthos scoparius*. GC  $\times$  GC has an enormous potential and supe-

riority compared to traditional mono dimensional and multidimensional techniques (Mondello, Casilli, Tranchida, Dugo, & Dugo, 2005).

#### 4.4 | Characterization and quantification of the volatiles of the hydrodistilled essential oil by GC-FID-MS

The percentage composition of individual compounds of *P. scoparius*' essential oil (FP and DP) obtained by hydrodistillation are listed in Table 2. A total of 48 compounds, representing 93.5% (FP) and 92.8% (DP) of the essential oil were identified by GC-MS and compared with those of reference substances. Quantitative data were based on peak area calculations. The average yield in essential oil was  $(0.502 \pm 0.091)\%$  (w/w). Monoterpenes are the most abundant compound group of the essential oil, as emphasized by the MHE-GC-FID-MS analysis and GC  $\times$  GC analysis. The major constituents of the oil were mainly belonging to the monoterpenes hydrocarbons class: sabinene,  $\alpha$ -pinene,  $p$ -cymene,  $\alpha$ -thujene, and  $\beta$ -pinene. But also oxygenated monoterpenes like terpinen-4-ol and spathulenol are present in the essential oil. As also reported previously, other components such as: sesquiterpene hydrocarbons, oxygenated sesquiterpenes and aromatic derivatives of monoterpenes were also detected (Table 2).

From Table 2, it can be seen that the major components were detected in both FP and DP, mainly the monoterpenes hydrocarbons, with slight differences in their contents. This is in agreement with the densitograms obtained with HPTLC (Figure 2), where major constituents were detected in both FP and DP.

The chemical profile of the essential oil from the present study is similar to that reported by (Vérité et al., 2004), but the contents of major components are different, so that those reported in our study are higher. Also, sabinene is reported to be the most abundant compound in our study, whereas no trace of this compound was reported

TABLE 2 Chemical profile of the essential oil extracted by hydrodistillation from *P. scoprius*

	Compound <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	MW <sup>c</sup>	Fresh plant (FP) (%)	Dried plant (DP) (%)
1	$\alpha$ -Thujene	924	136	5.3	5.7
2	$\alpha$ -Pinene	931	136	34.4	23.6
3	Dehydrosabinene	940	134	-	<0.1
4	Camphene	944	136	0.2	<0.1
5	Verbenene	949	134	<0.1	0.1
6	Sabinene	971	136	16.3	26.5
7	$\beta$ -Pinene	973	136	5.5	2.4
8	Myrcene	990	136	1.4	1.0
9	$\alpha$ -Phellandrene	1003	136	0.3	0.4
10	$\delta$ -Carene	1008	136	1.9	-
11	$\alpha$ -Terpinene	1014	136	<0.1	0.7
12	p-Cymene	1022	134	10.1	8.6
13	Limonene	1026	136	1.9	1.3
14	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimene	1037	136	3.9	1.2
15	$\gamma$ -Terpinene	1055	136	0.2	1.9
16	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1063	154	0.3	0.2
17	Terpinolene	1085	136	0.2	0.7
18	$\alpha$ -Thujone	1113	152	<0.1	0.2
19	p-Menth-2-en-1-ol	1117	154	0.3	0.5
20	$\alpha$ -Campholene aldehyde	1122	152	<0.1	0.1
21	Alloocimene	1128	136	0.3	<0.1
22	Pinocarveol	1134	152	0.3	0.2
23	<i>cis</i> -Verbenol	1141	152	0.6	0.5
24	Sabina ketone	1152	138	<0.1	0.2
25	Terpinen-4-ol	1174	154	4.1	9.7
26	p-Cymen-8-ol	1182	150	0.6	0.9
27	$\alpha$ -Terpinoeol	1187	154	0.3	0.5
28	Myrtenal	1191	150	0.4	0.6
29	Estragole	1195	148	0.1	0.9
30	Verbenone	1204	150	0.4	0.5
31	<i>trans</i> -Carveol	1218	152	<0.1	<0.1
32	<i>cis</i> -Carveol	1222	152	<0.1	<0.1
33	Cuminaldehyde	1239	148	<0.1	<0.1
34	Carvone	1244	150	0.2	-
35	Phellandral	1278	152	<0.1	<0.1
36	Carvacrol	1311	150	0.2	-
37	$\alpha$ -Copaene	1374	204	0.2	-
38	$\beta$ -Damascenone	1382	190	<0.1	<0.1
39	$\beta$ -Cubebene	1387	204	0.1	-
40	Methyl eugenol	1403	178	0.2	-
41	$\alpha$ -Humulene	1447	204	-	<0.1
42	$\alpha$ -Muurolole	1496	204	<0.1	-
43	$\delta$ -Cadinene	1519	204	0.2	0.2
44	$\alpha$ -Calacorene	1536	200	<0.1	0.1
45	Spathulenol	1571	220	1.5	0.8
46	Caryophyllene oxide	1575	220	0.3	0.5

TABLE 2 (Continued)

	Compound <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	MW <sup>c</sup>	Fresh plant (FP) (%)	Dried plant (DP) (%)
47	$\tau$ -Muurolol	1638	222	0.7	1.1
48	$\beta$ -Eudesmol	1644	222	0.2	0.6
	Total			93.5	92.8
	Monoterpene hydrocarbons			71.7	65.7
	Oxygenated monoterpenes			7.2	13.4
	Aromatic monoterpenes			11.3	10.4
	Sesquiterpene hydrocarbons			0.6	0.4
	Oxygenated sesquiterpenes			2.8	3.0

<sup>a</sup>Compounds listed in order of elution from a ZB-5HT fused silica capillary column.

<sup>b</sup>Retention indices of the compounds calculated on the basis of Van den Dool and Kratz formula.

<sup>c</sup>Molecular Weight for MW.

in the study of the previous authors. The latter stipulated that the qualitative and quantitative differences could be due to climatic and geographical conditions (difference of period and of geographic area of collection or both), or to the existence of different chemotypes. Indeed (Lograda et al., 2013), confirmed the existence of three chemotypes in Algerian populations of *P. scoparius* and that the variability of terpenoids reflects the heterogeneity of the genetic structure of *Pituranthos scoparius*. The chemical profile of the essential oil in our study falls in the Sabinene chemotype, as this chemotype is widespread among populations found in northeastern Algeria.

#### 4.5 | TLC-DPPH\* dipping method of the essential oil

Recently, a new technique combining DPPH\* with TLC was reported by (Cieřla et al., 2012). This technique was carried out on (FP) and (DP) essential oil, after developing the plate as previously described. The images were taken before (366 nm) and after (Vis R) dipping in DPPH\* and the result is depicted (Figure 1b). From the latter, two intense and bright bands were observed for the essential oil. FP showed a higher intensity under 366 nm, while DP showed a higher intensity under remission illumination light (Vis R). This can be explained likely by the fact that compounds of DP interact highly with DPPH\* after dipping. Due to their redox properties, essential oils and their bioactive constituents can act as antioxidants (Kasrati, Jamali, Bekkouche, Wohlmuth, Leach, & Abbad, 2014) when their chemical structure allows a free radical scavenging reaction and/or the chelation of redox-active metals (Fraga, Oteiza, & Galleano, 2014). The brightening intensity of the bands observed may suggest the power of the radical scavenging activity related to the compounds present in the essential oil studied and/or a synergistic phenomena among the bioactive compounds contained. The presence of oxygenated monoterpenes in DP (13.4%) may play a major role and contribute significantly to the antioxidant activity. Terpenes of several essential oils, flavonoids, and phenolics exhibit significant antioxidant effects (Raut & Karuppaiyl, 2014). An oxygenated monoterpene (terpinen-4-ol), present as a major compound in DP (9.7%), can be considered as a potential contributor to the antioxidant activity. Due to its high structural similarity to thymol and carvacrol (well known as the best antioxidants in several essential oils), it is

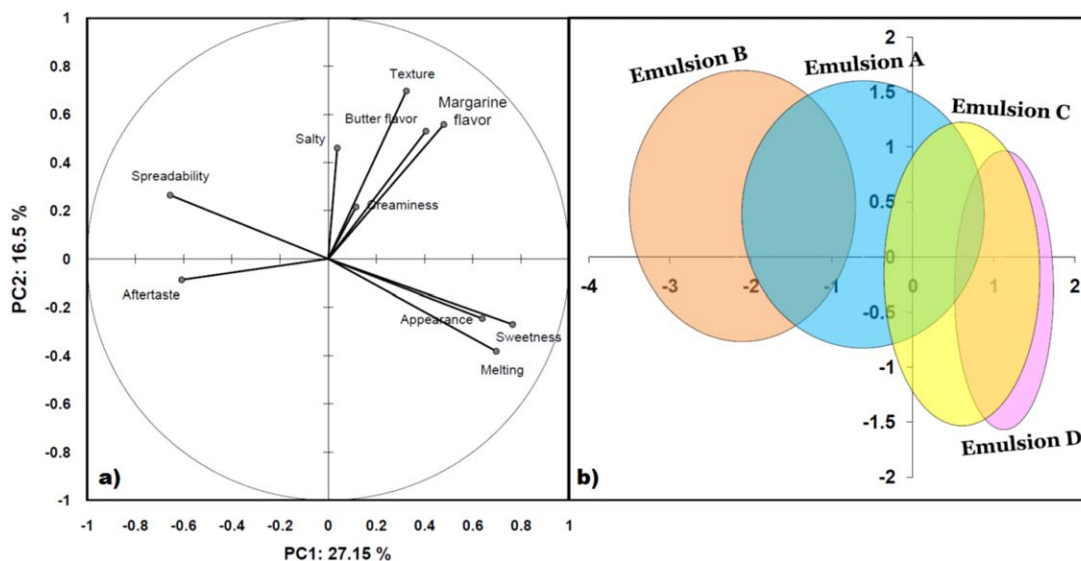
believed to act efficiently against lipid oxidation. Two schemes of interaction between the antioxidant species can be proposed: hydrogen donation of the more active antioxidant to regenerate the other antioxidant and formation of heterodimer from the moieties of the antioxidant during autoxidation (de Guzman, Tang, Salley, & Ng, 2009). The antioxidant capacity of the plant extracts is due to the presence of bioactive compounds acting as hydrogen donors to the radical involved in the oxidation reaction (Cordeiro et al., 2013).

#### 4.6 | Oxidative stability by the rancimat method

The effect of the essential oil incorporation, with different concentrations on oxidative stability of the whey spread emulsion was evaluated by Rancimat equipment. The hydrodistilled essential oil from the dried state of the plant material (DP) is chosen for the incorporation, based on the results of TLC-DPPH\* method and its content in oxygenated monoterpenes (Table 2).

The essential oil of *P. scoparius* was found to be more effective in stabilizing the emulsion against oxidative deterioration as compared to the control emulsion containing the  $\alpha$ -tocopherol as antioxidant. The recorded induction period for the emulsion added with 100 mg kg<sup>-1</sup> of the essential oil of *P. scoparius* (20.80  $\pm$  0.03)h is higher than the latter (14.41  $\pm$  0.04) h ( $\rho \leq 0.05$ ). The blend of the control emulsion contains PO, SFO, and SBO. According to Lee, Jeung, Park, Lee, & Lee (2010) and Seppanen, Song, & Saari Csallany (2010), the degradation of tocopherols was temperature sensitive in sunflower and soybean oils and even for the  $\alpha$ -tocopherol added as an antioxidant. The concentration of 100ppm of the essential oil added into the emulsion is determined according to the internal standards of the food industry. Therefore, the addition of antioxidants in low concentrations into a fat system was very important for its oxidative stability (Rios, Santos, Maia, & Maz-zetto, 2013).

These results are strongly supported by the data previously obtained, displaying the occurrence of bioactive molecules in the essential oil (terpenes), responsible for the antioxidant activity. Indeed, it is suggested from this study that the essential oil of *P. scoparius* could improve significantly the preservation process, delay lipid oxidation phenomena and therefore ensure a high oxidative stability of fat



**FIGURE 5** Principal component analysis (PCA) of four emulsions: emulsion A (control emulsion), emulsion B (emulsion containing 100 ppm essential oil), emulsion C (emulsion containing 300 ppm essential oil), and emulsion D (emulsion containing 600 ppm essential oil). The attributes assessed were spreadability, creaminess, sweetness, melting, appearance, texture, butter-like flavor, margarine-like flavor, salty, and aftertaste

products. There is a strong evidence from recent reserches that anti-oxidants play a very important role in increasing the oxidative stability of food emulsions (Lante & Friso, 2013). This can be also translated by improving the shelf life of these products, acting even better than  $\alpha$ -tocopherol, which is widespreadly used in fat and oil industry.

MHE-GC-FID-MS allowed to quantify and identify the major terpene groups of the essential oil from the fresh plant material. Since antioxidants are commonly used under conditions of high temperature in food processing and cooking (Nakatani, Tachibana, & Kikuzaki, 2001), Rancimat test can be representative of the extent at which these antioxidants can protect the food emulsion from oxidation. Highest oxidative stability was obtained for the emulsion incorporated with the essential oil. From Table 2 and Figure 4, an oxygenated monoterpene, namely terpinen-4-ol, was detected in the essential oil and accounts for the major components of DP essential oil. This latter is likely responsible for the antioxidant activity of the essential oil, due to the hydroxyl group located on the aromatic ring, as the CHO fraction is the most potent antioxidant (Kulicic, Radonic, Katalinic, & Milos, 2004). Its structure is close to other two phenol terpenes: thymol and carvacrol, responsible for the antioxidant activity of most of essential oils. Practically, these phenols take part in chain initiation during oxidation with an order of magnitude higher than  $\alpha$ -tocopherol, then reacting faster with lipids (Ruberto & Baratta, 2000; Yanishlieva, Marinova, Gordon, & Raneva, 1999). Also, from Table 2, two abundant components were detected:  $\gamma$ -terpinene and p-cymene. In fact, The mechanism of chain termination during the oxidation of  $\gamma$ -terpinene has been investigated in detail by (Amorati, Foti, & Valgimigli, 2013), hypothesizing that the driving force for the overall process is the formation of aromatic p-cymene and the very fast decay of neutral superoxide radical. In other terms, the presence of  $\gamma$ -terpinene will cause an overall increase in the rate of oxidative chain termination, thereby shortening

the chain length and reducing the overall rate of oxidation. From our findings, the essential oil of *P. scoparius* gave a high protection for the emulsion from oxidation, even better than  $\alpha$ -tocopherol. Moreover, Prakash, Kedia, Mishra, and Dubey (2015) reported that most of the essential oils are kept under the "GRAS" category by the FDA (Food and Drug Administration) and are approved as flavors and food additives. Taking into account these data, it can be postulated that the addition of antioxidant properties of each individual antioxidant could benefit from a synergistic effect. Moreover, the synergy among minor oxygen containing compounds has a determining role in the overall antioxidant activity expressed by the essential oil (Chougui et al., 2015; Kulicic et al., 2004).

#### 4.7 | Sensory evaluation

Principal component analysis (PCA) is a multivariate data compression technique that allows multiple treatments to be graphically displayed as they are differentiated by multiple variables. Therefore, it is usually applied to assess how several products were differentiated by several sensory descriptors (Drake, 2007).

For a better visualization of the relationships between the sensory attributes evaluated, a principal component analysis (PCA) was performed (Figure 5a). The two first axes explained 43.6% of the variability and allowed to visualize the projection of the four studied emulsions (Figure 5b). The first principal component (PC) explaining 27.15% of variability was mainly characterized by sweetness, melting and appearance on the right positive side of the axis and spreadability and aftertaste on the left negative side. The second PC explaining 16.5% of variability was mainly characterized by margarine flavor, butter flavor and texture on the right positive side of the axis. The PCA allowed the separation of emulsions B (100 ppm

essential oil) and C (300 ppm essential oil), D (600 ppm essential oil) in comparison to the emulsion A (control emulsion, 100 ppm  $\alpha$ -tocopherol). Emulsion B was appreciated for its spreadability and aftertaste as these both attributes are projected on the right side of the PCA. In contrast, emulsion C and D are characterized by sweetness, melting and appearance. This tendency can be explained by the concentration of the essential oil in each emulsion. Since emulsions C and D are positioned close to each other, we can assume that the tasters did not differentiate between the two emulsions containing 300 and 600 ppm as they did for the emulsion containing 100 ppm. As the essential oil displayed the presence of volatiles (data obtained above), their perception by the tasters differ according to their content in the emulsions.

According to Moskowitz and Krieger (1995) foods are complex matrices and it is difficult to isolate the effect of a sensory input without confounding with other sensory inputs. Taste/Flavor, texture and appearance are respectively the most important attributes in terms of attribute liking on an aggregate basis.

One advantage from the PCA study is that the influence of some attributes can be highlighted, therefore taken as choice indicators for tasters (Chikhouné et al., 2014).

## 5 | CONCLUSION

From the present study, we can conclude that *P. scoparius* is a recoverable source of antioxidants in food industry, particularly in fat and oil industry. The results of antioxidant activity of the essential oil are encouraging to enhance its use in the field of food preservation. Indeed, its traditional use for health benefits, preservation from bacterial adulteration and aromatization in traditional cheese-making offers an opportunity to use it in fat and oil products. The results of Rancimat proved the valuable antioxidant power of the essential oil as a natural plant preservative and a green alternative to synthetic antioxidants. Its monoterpenes composition explains, for a great part, its radical-scavenging properties. Our results are promising when considered in light that these antioxidants are excellent biopreservative candidates, to replace the commonly used  $\alpha$ -tocopherol. It would be interesting to perform an intensive cultivation of the plant in the locations of high plateau, to develop a local economic strategy for the use and the valorization of the plant. Also, it is prominent to set up pilot plants for the extraction of the essential oil together with the adaptation of the set in a food processing chain. Other studies are needed also to improve the large scale cultivation of the plant, through the involvement of agronomists and botanists in order to encourage its use as a food additive.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors deeply thank the staff of CEVITAL for their support and assistance. Special thanks to Mr. Abderrahmane TOUNSI, head of laboratory of Quality Control for Fat Products, Mr. Samir HADJAL, Director of Research and Development and Azeddine MAOUCHE, Head of Department for Fat and Oils Quality Control for their valua-

ble help and assistance. The authors thank also INATAA, University of Brothers Mentouri Constantine for financial support and the National Institute of chemistry, together with the Slovenian Research Agency for their contribution to achieve this work.

## REFERENCES

- Adachi, S., Minten, S., & Kobayashi, T. (2009). Oxidation of lipid in bulk and dispersion systems. *Japan Journal of Food Engineering*, 10, 9–15.
- Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10835–10847.
- Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée Marocaine Traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Edition Ibis Press. Paris. pp. 164-165.
- Boutaghane, N., Nacer, A., Kabouche, Z., & Ait-Kaki, B. (2004). Comparative antibacterial activities of the essential oils of stems and seeds of *Pituranthos scoparius* from Algerian septentrional Sahara. *Chemistry of Natural Compounds*, 40, 606–607.
- Calligaris, S., Manzocco, L., & Nicoli, M. C. (2007). Modelling the temperature dependence of oxidation rate in water-in-oil emulsions stored at sub-zero temperatures. *Food Chemistry*, 101, 1019–1024.
- Chikhouné, A., Bedjou, F., Oubouid, S., Boukefoussa, R., Bechri, B., Tarmoul, H., Abdeladim, T., ... Kouadri, L. (2014). Development of sugar cane molasses in formulations of madeleines, mini croissants, and buns incorporated with interesterified oil. *Journal of Chemistry*, 2014, 8.
- Chougui, N., Djerroud, N., Naraoui, F., Hadjal, S., Aliane, K., Zeroual, B., & Larbat, R. (2015). Physicochemical properties and storage stability of margarine containing *Opuntia ficus-indica* peel extract as antioxidant. *Food Chemistry*, 173, 382–390.
- Cieśla, Ł., Kryszewski, J., Stochmal, A., Oleszek, W., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2012). Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 126–135.
- Cordeiro, A. M. T. M., Medeiros, M. L., Santos, N. A., Soledade, L. E. B., Pontes, L. F. B. L., Souza, A. L., Queiroz, N., & Souza, A. G. (2013). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 113, 889–895.
- de Guzman, R., Tang, H., Salley, S., & Ng, K. S. (2009). Synergistic effects of antioxidants on the oxidative stability of soybean oil-and poultry fat-based biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 459–467.
- Drake, M. A. Invited review: Sensory analysis of dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 90, 4925–4937.
- Fraga, C. G., Oteiza, P. I., & Galleano, M. (2014). *In vitro* measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840, 931–934.
- Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 35, 42–51.
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22, 273–292.
- Kasrati, A., Jamali, C. A., Bekkouche, K., Wohlmuth, H., Leach, D., & Abbad, A. (2014). Comparative evaluation of antioxidant and insecticidal properties of essential oils from five Moroccan aromatic herbs. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2312–2319.
- Kiokias, S., Dimakou, C., Tsaprouni, I., & Oreopoulou, V. (2006). Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophysics*, 1, 115–123.

- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidant activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85, 633–640.
- Lante, A., & Friso, D. (2013). Oxidative stability and rheological properties of nanoemulsions with ultrasonic extracted green tea infusion. *Food Research International*, 54, 269–276.
- Lee, S. W., Jeung, M. K., Park, M. H., Lee, S. Y., & Lee, J. (2010). Effects of roasting conditions of sesame seeds on the oxidative stability of pressed oil during thermal oxidation. *Food Chemistry*, 118, 681–685.
- Lograda, T., Ramdani, M., Kiram, A., Chalard, P., & Figueredo, G. (2013). Variation of essential oils composition of *Pituranthos scoparius* in Algeria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants and Indigenous Medicine*, 2, 1–9.
- Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P., Dugo, P., & Dugo, G. (2005). Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 136–140.
- Moskowitz, H. R., & Krieger, B. (1995). The contribution of sensory liking to overall liking: An analysis of six food categories. *Food Quality and Preference*, 6, 83–90.
- Nakatani, N., Tachibana, Y., & Kikuzaki, H. (2001). Establishment of a model substrate oil for antioxidant activity assessment by oil stability index method. *Journal of American Oil Chemists Society*, 78, 19–23.
- Nègre, R. (1961). *Petite flore des régions arides du Maroc occidental*. Paris: CNRS.
- Nenaah, G. E. (2014). Chemical composition, toxicity and growth inhibitory activities of essential oils of three *Achillea* species and their nano-emulsions against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Industrial Crops and Products*, 53, 252–260.
- Ponginebbi, L., Nawar, W. W., & Chinachoti, P. (1999). Oxidation of linoleic acid in emulsions: Effect of substrate, emulsifier, and sugar concentration. *Journal of American Oil Chemists Society*, 76, 131–138.
- Pothier, J., Galand, N., El Ouali, M., & Viel, C. (2001). Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme. *Il Farmaco*, 56, 505–511.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities—Potentials and challenges. *Food and Control*, 47, 381–391.
- Purcaro, G., Cordero, C., Liberto, E., Bicchi, C., & Conte, L. S. (2014). Toward a definition of blueprint of virgin olive oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1334, 101–111.
- Raut, J. S., & Karuppaiyl, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–264.
- Rios, M. S., Santos, F. P., Maia, F. N., & Mazzetto, S. (2013). Evaluation of antioxidants on the thermo-oxidative stability of soybean biodiesel. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 112, 921–927.
- Ruberto, G., & Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69, 167–174.
- Seeley, J., Seeley, S., Libby, E., Breitbach, Z., & Armstrong, D. (2008). Comprehensive two-dimensional gas chromatography using a high-temperature phosphonium ionic liquid column. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 323–332.
- Seppanen, C., Song, Q., & Saari Csallany, A. (2010). The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats, and food systems. *Journal of American Oil Chemists Society*, 87, 469–481.
- Shashkov, M., & Sidelnikov, V. (2013). Properties of columns with several pyridinium and imidazolium ionic liquid stationary phases. *Journal of Chromatography: Part A*, 1309, 56–63.
- Vérité, P., Nacer, A., Kabouche, Z., & Seguin, E. (2004). Composition of seeds and stems essential oils of *Pituranthos scoparius* (Coss. & Dur.) Schinz. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 562–564.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., & Raneva, V. G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64, 59–66.

**How to cite this article:** Chikhouné A, Damjan Pavleca J, Shashkov M, et al. Antioxidant effect induced by the essential oil of *Pituranthos scoparius* in a formulation of a whey spread emulsion. *J Food Process Preserv*. 2017;00:e13163. doi:10.1111/jfpp.13163.



# Stabilité oxydative et interactions protéine- polyphénols

Effet des extraits polyphénoliques  
de *H. sabdariffa* dans une émulsion  
formulée à l'échelle pilote

## Introduction

*Hibiscus sabdariffa*, connue sous les noms de la Sorrelle de Guinée (France), Roselle (Grande Bretagne), Karkadé ou Bissap (Afrique), est une plante herbacée qui pousse dans les régions tropicales et subtropicales. Elle est exploitée pour ses fibres mais principalement pour ses calices comestibles. L'extrait obtenu de cette plante peut être utilisé comme colorant alimentaire naturel, rentre dans les émulsions de boissons carbonatées et est réduit en poudre par lyophilisation. Elle est native de l'Afrique (Egypte, Sénégal, Mali, Tchad, Burkina Faso et la Guinée), mais elle est présente également en Thaïlande, Vietnam, Malaisie, Chine et Mexique (Paul, 1995 ; Hassan et Hobani, 1998 ; McClintock et El Tahir, 2004). En général, la récolte s'effectue de Juin à Septembre pour les feuilles, Octobre pour les calices et fin Octobre-début Novembre pour les graines (Endrias, 2006).

*H. sabdariffa* est également riche en composés phénoliques, les anthocyanines en particulier. Ces pigments sont responsables de la coloration rougeâtre des calices et une source potentielle en antioxydants. L'activité antioxydante des anthocyanines confère aux boissons à base d'*Hibiscus* des propriétés antioxydantes intéressantes (Tsai *et al.*, 2004 ; Cissé *et al.*, 2009). Les anthocyanines sont des pigments flavonoïdes hydrosolubles qui dépendent du pH et dans certains cas d'agents de complexation, contribuant à la formation de diverses couleurs rouge, pourpre et bleue (Mendoza-Diaz *et al.*, 2012). Ces molécules bioactives sont d'importance majeure dans les émulsions lipidiques, puisqu'elles les protègent contre l'oxydation. Le phénomène d'oxydation affecte visiblement la stabilité d'un large nombre d'aliments qui existent sous forme d'émulsions (Calligaris *et al.*, 2007), conduisant à des caractéristiques sensorielles indésirables pour les aliments auto-oxydés (St Angelo, 1992). Il a été rapporté que les anthocyanines et les autres composés phénoliques sont la source majeure de la capacité antioxydante de l'extrait de l'*Hibiscus*. Ils peuvent piéger les radicaux libres, participent dans la régénération des autres antioxydants et protègent les constituants cellulaires contre les dommages oxydatifs (Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2007). Le pouvoir réducteur est la capacité d'une substance ou d'une molécule à transférer un électron ou donner un atome d'hydrogène. Malgré que plusieurs mécanismes soient attribués aux antioxydants, il y a plusieurs auteurs qui considèrent que la capacité réductrice d'un composé comme un indicateur significatif de son potentiel antioxydant (Bidie *et al.*, 2013). Les analyses qualitatives et quantitatives simultanées des antioxydants est possible par le test bio-autographique HPTLC-DPPH• (Gu *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2015). Dans ce cas, le méthanol et l'acétone améliorent la détermination de l'activité scavenging des radicaux libres *in vitro* des extraits phénoliques à travers la protonation

des groupements hydroxyles attaché à l'anneau aromatique (Ciesla *et al.*, 2012). Un avantage majeur de la technique TLC-DPPH• à localiser les fractions actives à activité scavenging d'un mélange complexe, permettant la détection des composés ou fractions de composés actifs à l'égard des radicaux libres. Cette méthode est abordable est simple et facilite un screening rapide des molécules bioactives en solution (Yrjönen *et al.*, 2003). Les antioxydants peuvent être extraits par diverses et nombreuses techniques d'extraction classiques. Cependant, à cause de limitations liées au temps d'extraction, solvants et consommation d'énergie (Azmir *et al.*, 2013), des techniques non conventionnelles telles les extractions assistées par microondes et ultrasons ont été développées. Plusieurs classes d'antioxydants ont été isolées de matrices végétales naturelles grâce à l'usage de l'extraction assistée par microondes (Li *et al.*, 2013). L'extraction assistée par ultrasons est un outil très puissant et versatile dans le domaine de la phytopharmacie industrielle, pouvant être utilisée à petite et à grande échelle (Vinatoru, 2001). Une fois les antioxydants extraits, il est imminent de choisir les méthodes analytiques hautement sensibles et sélectives pour leur détermination (Liu *et al.*, 2008). Ces méthodes doivent être consistantes, rapides et riches en informations spectrales (Ignat *et al.*, 2011).

Les fromageries modernes et industries des caséines produisent un sous-produit, considéré depuis longtemps comme un déchet et récemment mis au goût du jour : le lactosérum (Smithers, 2008). Ayant comme origine le lait des mammifères, il est considéré comme un liquide dilué contenant 6% de solides totaux, représenté principalement par le lactose (70%) et les protéines du lactosérum (0-7%) (Zall, 1992). Les principales activités biologiques des protéines et peptides ayant pour origine les sécrétions mammaires ont été rapportés (Schanbacher *et al.*, 1997). Une revue de littérature scientifique exhaustive a fourni une multitude de preuves quant à l'efficacité des protéines laitières à réguler les fonctions physiologiques spécifiques dans des expérimentations animale et humaine (Korhonen et Pihlanto, 2006). Au-delà de la nutrition de base, il y a de nombreuses preuves du potentiel des protéines de lactosérum et des peptides agissant en qualité d'ingrédients fonctionnels (Onwulata et Huth, 2009). Les protéines majoritaires du lactosérum sont la  $\beta$ -lactoglobulines ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La) et l'albumine du sérum bovin (ASB ou en encore bovin serum albumin, BSA). Ces protéines contiennent tous les acides aminés indispensables et surpassent les autres protéines en qualité, appuyant leur impact positif et leurs bénéfices santé (Keri Marshall, 2004 ; Madureira *et al.*, 2007). Les protéines du lactosérum montrent également des caractéristiques fonctionnelles uniques telles que propriétés gélifiantes, épaississantes (Bryant et McClements, 1998), émulsifiantes et moussantes (Herceg *et al.*, 2007 ; Farrag, 2008).

La présente étude a été motivée par deux aspects : le premier étant la valorisation du lactosérum issu d'une laiterie-fromagerie locale (SAFILAIT SPA, Constantine) dans une formulation alimentaire. En effet, ce n'est que récemment que l'entreprise en question a commencé à mettre en place un dispositif pour la valorisation et la transformation du lactosérum qui était auparavant inexploité. Sachant les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum, le second aspect était d'investiguer la possibilité d'interactions entre les protéines de ce dernier et les polyphénols des extraits incorporés. Il était surtout question de rechercher ces interactions au sein de la phase aqueuse, composante mineure de l'émulsion contenant les composés hydrosolubles. La stratégie a consisté à sélectionner les extraits polyphénoliques d'*H. sabdariffa* ayant les pouvoirs réducteurs les plus élevés, puis les incorporer dans une émulsion à base de lactosérum. Les émulsions sont d'abord testées pour leur stabilité oxydative, puis laissées pour stockage au réfrigérateur. Une récupération de la phase aqueuse a été entreprise et une séparation par électrophorèse Tricine SDS-PAGE a été réalisée pour les phases aqueuses des émulsions étudiées ainsi que le lactosérum témoin. L'apport de la LC-ESI-MS/MS est capital pour l'investigation des protéines et/ou peptides engagés dans les liaisons avec les polyphénols de l'Hibiscus. Cette démarche constitue un véritable challenge car effectuée sur une matrice alimentaire complexe. En Figure 30 est présenté le layout global de l'étude, avec les retombées phares des aspects étudiés.

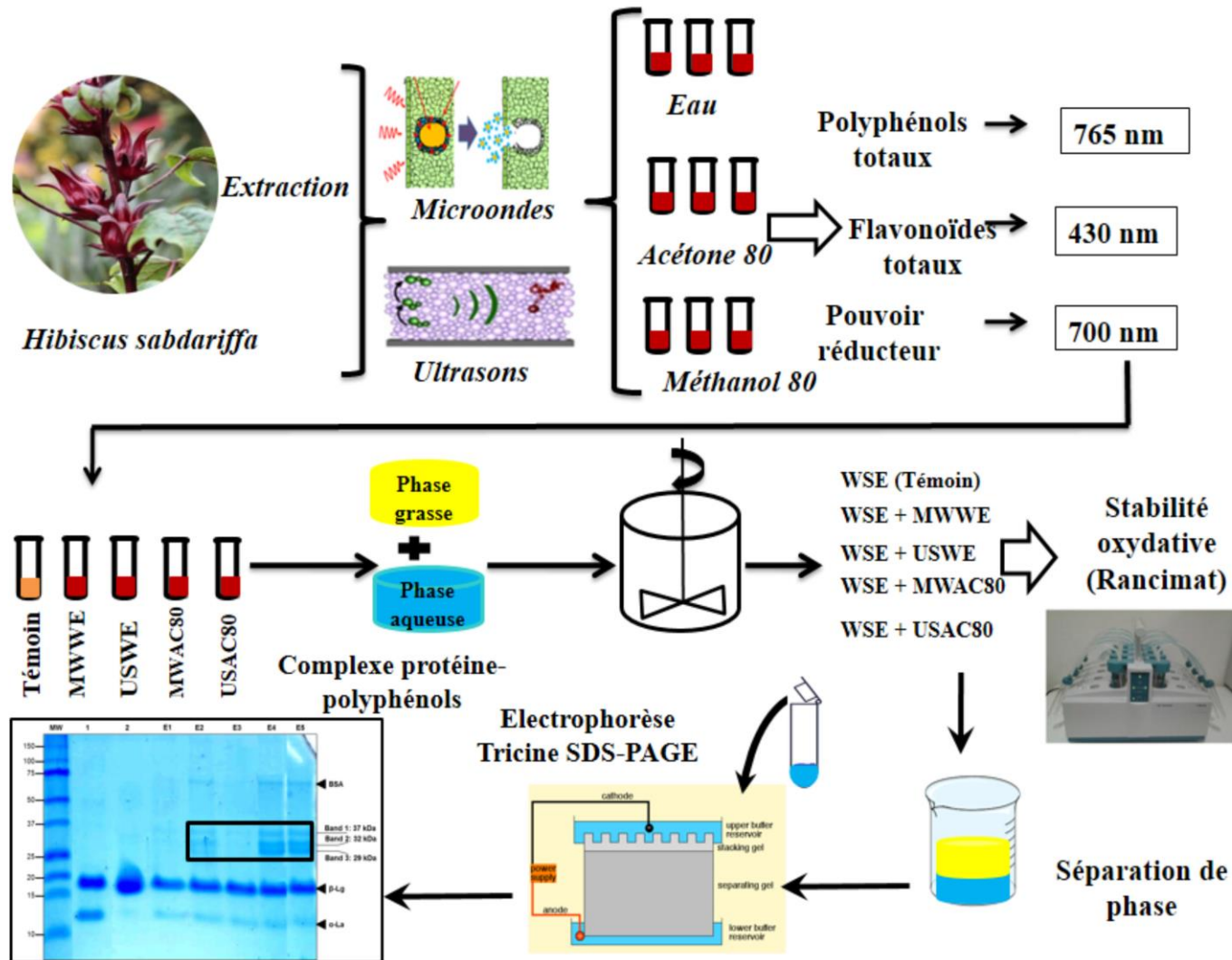


Figure 30 : layout global de la démarche suivie pour l'étude des interactions protéine-polyphénols dans une émulsion type spread.

**Antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* extracts incorporated in an emulsion system containing whey proteins: oxidative stability and polyphenol-whey proteins interactions**

Chikhoun A., Gagaoua M., Nanema K.D., Souleymane A.S., HAFID K., Aliane K., Hadjal S., Madani K., Sentandreu E., Sentandreu M.A, Boudjellal A., Križman M. et Vovk I.  
Publié dans *Arabian Journal for Science and Engineering* (2017) 42: 2247 - 2260.

---

**Résumé**

Cette étude a été réalisée sous le concept de la valorisation des extraits antioxydants de l'*Hibiscus sabdariffa*, pour application à l'échelle industrielle. L'extraction des antioxydants (polyphénols, flavonoïdes et anthocyanines totaux) a été entreprise à partir des calices de la plante, en utilisant des techniques d'extraction non conventionnelles (microondes et ultrasons) et l'utilisation de différents solvants (eau, acétone à 80% et méthanol 80%). Les résultats obtenus ont montré que l'extraction assistée par microondes utilisant l'acétone à 80% comme solvant d'extraction a donné la teneur la plus élevée en polyphénols totaux, exprimés en grammes équivalents d'acide gallique (EAG) par grammes de poids sec (g PS) (3,73 g EAG/g PS) ( $p < 0,05$ ). Les teneurs les plus élevées en flavonoïdes et anthocyanines ont été obtenus pour les extraits aqueux issus des microondes et des ultrasons, exprimés en grammes équivalents de quercétine (EQ) par grammes de poids sec (g PS), respectivement de 0,74 g EQ/g PS ; 0,71 EQ/g PS et 0,30 g équivalents cyanidine-3-glucoside/100 g PS ( $p < 0,05$ ). Les extraits aqueux ont montré les pouvoirs réducteurs les plus élevés dans les extraits aqueux issus par microondes et ultrasons, exprimés en grammes équivalents acide ascorbique (EAA) par grammes de poids sec (g PS), respectivement de 3,91 g EAA/100 g PS et 3,35 g EAA/100 g PS. Par ailleurs, les extraits hydrométhanoliques et hydroacétoniques à 80% ont montré une activité de piégeage (scavenging) radicalaire plus élevée par chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC), en utilisant le réactif 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (HPTLC-DPPH<sup>•</sup>). La chromatographie des différents composés phénoliques par HPTLC a révélé la présence de bandes représentant des anthocyanines sous forme de dimères. Le test de formulation de l'émulsion type spread à base de lactosérum à l'échelle pilote a montré une protection contre l'oxydation des lipides, la stabilité oxydative induite a été de 22,23 h. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide Tricine (SDS-PAGE) a révélé la formation de dimères issus d'interactions entre les polyphénols des extraits incorporés et les protéines de la phase aqueuse de l'émulsion. Les données du séquençage peptidique par chromatographie liquide, couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem et à ionisation par électrospray (LC-ESI-MS/MS), a confirmé les interactions entre les peptides et les polyphénols. Ces dernières ne montrent pas un effet préjudiciable sur la stabilité oxydative des émulsions incorporées par les extraits antioxydants. Cette étude suggère vivement la possibilité d'utilisation des calices de l'*Hibiscus* comme bioconservateurs en alimentaire.

---

**Mots clés :** *Hibiscus sabdariffa*, antioxydants ; émulsion ; activité antioxydante ; stabilité oxydative ; interactions protéines-polyphénols ; bioconservateurs.

# Antioxidant Activity of *Hibiscus sabdariffa* Extracts Incorporated in an Emulsion System Containing Whey Proteins: Oxidative Stability and Polyphenol–Whey Proteins Interactions

Anis Chikhoun<sup>1</sup> · Mohammed Gagaoua<sup>1</sup> · Koudougou Désiré Nanema<sup>2</sup> · Ahamat Souleymane Souleymane<sup>2</sup> · Kahina Hafid<sup>1</sup> · Khellaf Aliane<sup>3</sup> · Samir Hadjal<sup>3</sup> · Khodir Madani<sup>4</sup> · Enrique Sentandreu<sup>5</sup> · Miguel Ángel Sentandreu<sup>6</sup> · Abdelghani Boudjellal<sup>1</sup> · Mitja Krizman<sup>7</sup> · Irena Vovk<sup>7</sup>

Received: 8 August 2016 / Accepted: 19 January 2017  
© King Fahd University of Petroleum & Minerals 2017

**Abstract** This study was designed within the scope of industrial exploitation of antioxidant extracts from *Hibiscus sabdariffa*. Efficiency in the extraction of antioxidants (total phenolics, flavonoids and anthocyanins) from calyces was assessed through different processes involving solvents (water, 80% acetone and 80% methanol), microwaves and ultrasounds. Results indicated that microwave extraction with 80% acetone gave the highest yield for total phenolics, expressed as gallic acid equivalents (GAE) per g dry weight (DW) (3.73 GAE/100 g DW), while the highest results for total flavonoids and anthocyanins were found in the microwaved aqueous extracts. Antioxidant activity of the extracts reported the highest reducing power for aqueous extracts with microwave extraction, while 80% acetone and methanol samples exhibited the highest antioxidant activity

by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) reagent. HPTLC performed for screening of phenolic compounds revealed the occurrence of anthocyanins in dimer-like bands. Laboratory tests showed high protection against lipid oxidation of the whey spread emulsion (22.32h) incorporated with the sonicated aqueous extract. Results of peptide sequencing data by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS), after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis, revealed protein–polyphenols interactions by the formation of dimers between polyphenols and protein/peptides. These interactions were found without effect on the oxidative stability of the emulsions. These study suggest that *H. sabdariffa*'s calyces have the potential to be used like food antioxidants.

✉ Anis Chikhoun  
anis.chikhoun@gmail.com; chikhoun.anis@umc.edu.dz

- 1 Equipe Maquav, Laboratoire BIOQUAL, I.N.A.T.A.A., Université Frères Mentouri Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria
- 2 Département des Technologies Alimentaires, I.N.A.T.A.A., Université Frères Mentouri Constantine 1, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria
- 3 Département Recherches et Développement, Cévital spa, nouveau quai, port de Bejaia, BP 334, 06000 Bejaia, Algeria
- 4 Laboratory of Biomathematics, Biochemistry, Biophysics and Scientometrics, Abderrahmane Mira University of Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria
- 5 Dell Pediatric Research Institute, University of Texas at Austin, 1400 Barbara Jordan Blvd., Austin, TX 78723, USA
- 6 Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Calle Agustín Escardino, 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain
- 7 Department of Food Chemistry, National Institute of Chemistry, Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana, Slovenia

**Keywords** *Hibiscus sabdariffa* · Phenolics · Emulsion · Antioxidant activity · Oxidative stability · Protein–polyphenols interactions

## 1 Introduction

*Hibiscus sabdariffa*, known under the names of Guinea Sorrel (France), roselle (Great Britain), karkade or bissap (Africa), is an herbaceous, perennial plant that grows in tropical and subtropical areas. The species is exploited for its fiber and mainly for its edible calyces. Utilization of its extract may include natural food colorants, emulsions for carbonated drinks, spray dried extract and freeze dried extract. It is native to Africa (Egypt, Senegal, Mali, Chad, Burkina Faso, Guinea, etc.), but this plant is also present in Thailand, Vietnam, Malaysia, China, Mexico, etc. [1–3]. Harvest occurs

generally from June to September for the leaves, to October for calyces and late October—early November for seeds [4].

*Hibiscus sabdariffa* is also rich in phenolic compounds, especially anthocyanins; pigments responsible for the red color of calyces and potentially a good source of antioxidants. The antioxidant activity of anthocyanins gives *H. sabdariffa*-based drinks interesting antioxidant properties [5,6]. Anthocyanins are water-soluble flavonoid pigments that, depending on pH, and in some cases complexing agents can contribute to diverse colors such as red, purple and blue [7]. These bioactive compounds are very important in fat emulsions, since they protect them from oxidation. The oxidation phenomenon was reported to affect the stability of a large number of foods which exist as emulsions [8], leading to undesirable sensory characteristics of the auto-oxidized foods [9]. It was previously reported that anthocyanins and other phenolic compounds are the major source of antioxidant capacity in Roselle (*H. sabdariffa*) extract. They can scavenge free radicals, participate in regeneration of other antioxidants and protect cell constituents against oxidative damage [10]. The reducing power is the ability of a substance or a molecule to transfer an electron or give a hydrogen atom. Although several mechanisms are attributed to antioxidants, there are many authors who consider the reducing capacity of a compound as a significant indicator of its antioxidant potential [11]. The simultaneous qualitative and quantitative analysis of antioxidants is also possible by the method HPTLC-DPPH bioautographic assay [12,13]. In this case, methanol and acetone enhance the determined in vitro free radical-scavenging activity of phenolic extracts through the protonation of the hydroxyl groups attached to the phenolic ring [14]. One major advantage from the TLC-DPPH method is its ability to locate the radical-scavenging activity of a complex mixture, thus enabling detection of the most active components. This affordable method is simple and facilitates the quick screening of bioactive compounds in solution [15]. Antioxidants can be extracted from various plant materials by numerous classical extraction methods. However, due to limitations related to extraction time, solvent and energy consumption [16], non-conventional techniques like microwave- and ultrasound-assisted extractions have been developed. From microwave-assisted extraction, several classes of antioxidants have been efficiently separated from natural-plant resources [17]. Ultrasound-assisted extraction is a powerful and versatile tool in the phytopharmaceutical industry, being able to be used both on a small or large scale [18]. Once extracted, there is an increasing demand for highly sensitive and selective analytical method for the determination of antioxidants [19]. These methods must be comprehensive, rapid and rich in spectral information [20].

Modern cheese and casein industries produce a co-product, considered years ago as a waste, being nowadays

of a topicality: whey [21]. Originated from mammal's milk, it is considered as a dilute liquid containing 6% of total solids, represented mainly by lactose (70%) and whey proteins (0–7%) [22]. The major bioactivities arising from milk proteins and peptides of mammary secretions were reported [23]. An exhaustive scientific literature provided evidence on the efficiency of milk proteins to regulate specific physiological functions in experimental animals and humans [24]. Beyond basic nutrition, there are numerous evidences of the potential held by whey proteins and peptides to act as functional ingredients/food ingredients [25]. The most abundant whey proteins are  $\beta$ -LgA and  $\beta$ -LgB,  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -La) and bovine serum albumin (BSA). These proteins cover all the essential amino acids and have the highest protein quality compared to others. This supports the fact that whey proteins have positive impact and health benefits [26,27]. Whey proteins exhibit also unique functional characteristics like gelling, thickening [28], emulsifying and foaming properties [29,30].

The present study aimed to study the polyphenol–whey protein interactions in a real food emulsion consisting of a by-product of cheese-making: whey. Also, the study evaluated the impact on the oxidative stability and the role of such interactions in the final product. To reach these aims, samples from *H. sabdariffa* by microwave and ultrasound extraction techniques were firstly characterized for their content in total phenolics and antioxidant activity. Then, extracts showing the best antioxidant activity (reducing power) were selected for their incorporation in the whey spread emulsion. Separation and characterization of polyphenols by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) was the first step for the screening of antioxidants. Whey proteins and peptides were characterized using the liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry LC-ESI-MS/MS technique, and complexes formed with polyphenols were elucidated by tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). This research is the first report of protein macromolecules interactions with phenolics in a real food matrix.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Plant Material

*Hibiscus sabdariffa* plant was harvested in Ouagadougou (Burkina Faso) in October 2013. Calyces were manually shelled and then dried under the sun on racks for 3–4 days, packed in adequate bags (protected from light and moisture), transported to Constantine (Algeria) and preserved at room temperature until analysis. The plant material was certified by the Vegetable Ecological Laboratory, and the voucher specimens (#2016-Hibiscus Sabdariffa-AC-001-INATAA-





UFMC) have been deposited at INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algeria. Calyces were cut by hand into small pieces and crushed in a grinder to obtain a fine powder. The product was finally sieved through a 125  $\mu\text{m}$  screen.

## 2.2 Chemicals

Standards of gallic acid ( $\geq 99\%$ ), quercetin ( $\geq 98\%$ ), ascorbic acid ( $\geq 99\%$ ) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Iron (III) chloride and trichloroacetic acid (TCA) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The reagent Folin–Ciocalteu was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) reagent from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Formic acid (98–100%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), ethylacetate (99.5%) and methanol (99.9%) of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and the remaining reagents and solvents were of analytical grade.

## 2.3 Extraction of Phenolic Compounds

### 2.3.1 Microwave Extraction

It was carried out on a domestic microwave oven (NN-S674MF, Samsung, Malaysia) according to a previous optimized protocol [31] with slight modifications. Briefly, samples of 3 g of powdered plant material were separately extracted with 60 mL (water, 80% acetone or 80% methanol) in glass volumetric flasks of 250 mL each, connected to a refrigerant circuit. Suspensions were placed in the oven and irradiated for 120 s continuously to 400 W. Subsequently, flasks were cooled in a cold water bath and the extracts were recovered by filtration (Whatman paper #4). The powder retained by the filter was re-extracted in 40 mL of solvent a second time and then in 20 mL of solvent a third time to reach a final extraction volume of 120 mL. The filtrates were then centrifuged at 3500 rpm for 10 min at ambient temperature. The supernatant was then collected in an ambered bottle and stored at 4 °C until use.

### 2.3.2 Ultrasound Extraction

It was performed on an ultrasonic device (SONICS Vibra Cell, VCX 130 PB, Sonics & Materials, Newtown, USA) according to [32] with slight modifications. Briefly, samples of 3 g of plant material were extracted with 120 mL of water, 80% acetone or 80% methanol in a beaker covered with aluminum foil and placed in cold water. The suspensions were exposed to acoustic waves for 15 min at amplitude of 50%. The temperature was continuously controlled via a T-type thermocouple (Cooking, Thermo-Timer, China). Extracts were recovered by filtration (Whatman paper #4)

and centrifuged at 3500 rpm for 10 min. Supernatants were finally collected in ambered bottles and stored at 4 °C until analysis.

## 2.4 Determination of Total Phenolic Content

It was determined according to [33]. Briefly, 1 mL of Folin–Ciocalteu reagent (1:10, v/v) was added to 200  $\mu\text{L}$  of each extract. After 3 min, 800  $\mu\text{L}$  of sodium carbonate solution (7.5%; m/v) was added. Tubes were placed in darkness for 30 min, and the absorbance was recorded at 725 nm against a blank. Results were expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g dry weight (DW).

## 2.5 Estimation of Flavonoid Content

It was determined according to [34], with slight modifications. Briefly, 1 mL of each sample extract was separately mixed with 1 mL of 2% aluminum chloride solution. After incubation at room temperature for 15 min, the absorbance of the reaction mixture was measured at 430 nm and the flavonoid content was expressed in mg quercetin equivalents (QE) per 100 g dry weight (DW).

## 2.6 Determination of Total Anthocyanins

It was estimated by spectrophotometry according to [35] using the differential pH method and two buffers: potassium chloride (pH 1.0; 0.2 M) and sodium acetate (pH 4.5; 0.4 M). Briefly, 1 mL of each extract was added to 2.4 mL of buffer solution. The absorbance of the extract ( $A$ ) was measured at 510 nm ( $A_{510}$ ) and 700 nm ( $A_{700}$ ) against a blank using a UV–VIS spectrophotometer (50 SpectroScan, UK) and then calculated by the following equation:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$$

The content of total anthocyanins, expressed as g cyanidin-3-glucoside per 100 g dry weight (g Cy-3-glu/ 100 g DW), was calculated according to the following equation:

$$C = A \cdot MW \cdot DF \cdot 4000/\varepsilon$$

where  $A$  absorbance,  $MW$  molecular weight of cyanidin-3-glucoside,  $DF$  dilution factor and  $\varepsilon$ : molar extinction coefficient of cyanidin-3-glucoside ( $\varepsilon = 26,900$ ).

## 2.7 Screening of the Phenolic Compounds by High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)

Screening of the phenolic compounds was carried out by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC).



There were used 60 HPTLC silica gel plates with F 10 cm × 10 cm (Merck, Germany) (Art. No. 1. 05641) adapted to a twin-trough chamber (CAMAG, Muttenz, Switzerland) according to [36], with some modifications. Briefly, 16 and 2 μL of the sample and standard solutions, respectively, were applied in the form of 5 mm bands, at 8 mm from the bottom and 15 mm from the left edge of the plate (the space between two bands was set to 10 mm) with a Camag microliter syringe (25 μL syringe size) using an ATS4 auto-sampler (CAMAG) onto the HPTLC plate, 1 cm from the bottom edge. The plate was developed under saturated conditions for 15 min and to a distance of 80 mm, using the developing system of ethyl acetate/water/formic acid (85:15:10; v/v/v). After development, the plate was dried under warm stream, heated on a heater plate (CAMAG) at 110 °C during 3 min and sprayed with diphenylboric acid 2-amino ethyl ester (NST reagent, 1% solution in methanol) for few seconds. Then, the plate was dipped in paraffin—*n*-hexane (1:2, v/v) for enhancement and fixation. After dried over a warm stream and gently cleaned, the plate was photographed under natural luminescence at 366 nm and white light illumination, using DigiStore 2 Documentation System (CAMAG) operated with winCATS Version 1.4.1.8154 software.

## 2.8 Evaluation of the Antioxidant and Antiradical Activities

### 2.8.1 Reducing Power

The method described by [33] was used to determine the reducing power of the extracts, with slight modifications. The extract solutions (200 μL) were mixed with sodium phosphate buffer (pH 6.6, 0.2 M) and potassium ferricyanide (1%, w/v). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min, and 250 μL trichloroacetic acid (10%, w/v) was added, together with bidistilled water (1.0 mL) and 200 μL ferric chloride (0.1%, w/v). The absorbance was measured at 700 nm using ascorbic acid as a standard, and the results were expressed as ascorbic acid equivalents (AAE) per dry weight (DW).

### 2.8.2 Antiradical Activity by the HPTLC-DPPH Dipping Method

The plate HPTLC silica gel 60 plates without F 10 cm × 10 cm (Merck, Germany) (Art. No. 1. 05641) was developed in twin-trough chamber (CAMAG, Muttenz, Switzerland) according to [36], as described above. After development, the plate was dried under warm stream and then immersed for 5 s using chromatogram immersion device III (CAMAG), in a fresh solution of DPPH (0.2% in methanol; m/v) according to [14]. The plate was protected from daylight by covering the immersion device with aluminum foil, after removing the excess of DPPH and left in the dark to 30 min. The

experiment was performed in an ambient temperature. Then, the plate was immediately photographed, using DigiStore 2 Documentation System (CAMAG) operated with winCATS Version 1.4.1.8154 software.

## 2.9 Preparation of the Emulsion Incorporated with Antioxidant Extracts of *H. Sabdariffa*

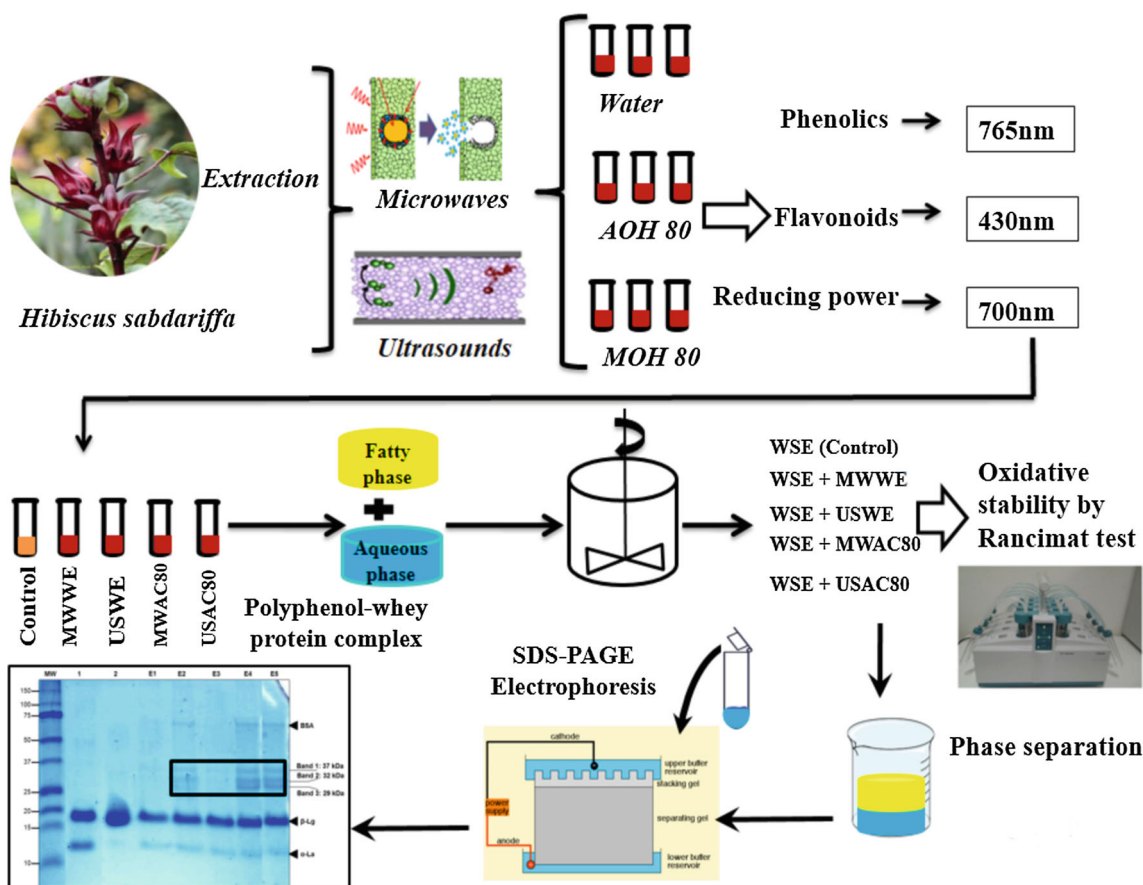
Before their incorporation in the emulsion, selected extracts (showing the best reducing power) were concentrated by evaporation in a rotavapor (Heidolph, Germany) at 40 °C.

The whey spread emulsion assayed was a water-in-oil (W/O) spread emulsion using two phases: the fatty phase (82%) containing soybean oil (SBO), sunflower oil (SFO) and palm oil (PO) (2:1:1; w/w/w) and an aqueous phase containing crude whey generously donated by a local food industry (SAFILAIT SPA, Constantine, Algeria) and collected during the dripping step of the cheese manufacture, explaining the presence of caseins and their interactions with polyphenols. The crude whey was pasteurized before use. In addition, lactic acid was used as a pH-correcting agent and emulsifier, whereas α-tocopherol (Vitamin E) was used as antioxidant in the fatty phase for the control. Oils and fats were melted in a drying oven at 65 °C and then weighed accordingly for 10 kg production batches (the minimum production for the pilot plant). The aqueous phase was therefore added slowly to the blend in the mixing tank, with continuous isothermal stirring at 45 °C for 30 min to ensure the homogeneity of the emulsion. Then, it was processed through a perfector pilot plant (Gerstenberg Schroder, Germany). The emulsion was pumped to the pasteurization section, heated to 80 °C (3–4 s) under vapor pressure (3 bar) and cooled to 45 °C. The tube cooler (A-unit) has a volume of 3 kg. The pin worker (B-unit) has a volume of 0.5 kg. The emulsion was pumped into the A-unit, where it was cooled to 22 °C. The emulsion reached its pasty consistency in the B-unit at a temperature of 13 °C. The scraper was rotated at 300 rpm, whereas the pin worker stirrer was at 400 rpm. The emulsion was finally recovered at the exit of the pin worker. Then, 250 g of emulsion and 25 mg of extract (25 mg of α-tocopherol for control emulsion) were weighed in an empty stick (boxes designed for emulsions), rigorously mixed for 15 min (to ensure homogenization) and put in a freezer for 1 h to complete the crystallization. The emulsion was stored in a refrigerator (6 °C) until use. A general layout of the formulation and the study of interactions is presented in Fig. 1.

## 2.10 Whey Proteins Determination

### 2.10.1 Protein Determination

Protein concentration was determined by method of Bradford (1976) using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). Bovine



**Fig. 1** General layout of the methodology carried out in the study of incorporation of natural antioxidants of *Hibiscus sabdariffa* in a water-in-oil emulsion and the interactions of polyphenol–whey proteins. AOH: acetone, MOH: methanol, MWWE: aqueous extract with

microwave, USWE: aqueous extract with ultrasounds, MWAC80: 80% acetone extract with microwave, USAC80: 80% acetone extract with ultrasounds and WSE: whey spread emulsion. The concentration for the antioxidants incorporated was set to 100 ppm

serum albumin (BSA) at a concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup> was used as standard.

2.10.2 Tricine SDS-PAGE

For the preparation of the aqueous phases for electrophoresis analysis, emulsions were incubated in a water bath regulated at 40 °C for melting. Aliquots of the aqueous phases were centrifuged at 4000 rpm 10 min at 10 °C, and the supernatants were collected and filtered through 2 μm filter membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). The aliquots were then prepared for electrophoresis according to [37] by means of Tricine SDS-PAGE.

2.10.3 Identification of Gel Protein Bands by LC-ESI-MS/MS

For the investigation of proteins involved in polyphenol–whey proteins interactions, protein bands appearing on the gel lanes corresponding to the aqueous phases of the assayed

emulsions were excised from the gel and in-gel digested with trypsin overnight (Fig. 3). Peptides obtained from each band were dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid and further analyzed using a Thermo Scientific Surveyor Plus HPLC coupled to a Thermo Finnigan LCQ Advantage ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) loading an electrospray ionization (ESI) source. Separation of peptides was carried out on a Jupiter Proteo C18 column (150 mm × 0.5 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). MS operating parameters were the following: electrospray ionization in positive mode; capillary temperature, 250 °C; collision (CID) energy, normalized to 35%; spray voltage, 4.5 kV; capillary voltage, 33.0 V. The first scan event was full MS detection for *m/z* values in the range 400–2000. The second scan event was a data-dependent MS/MS analysis of the most intense ions having charges from +1 to +4. LC-MS system and data acquisition were controlled by a PC loading the Thermo Scientific Xcalibur v2.07 software. Peptide identification was done from the information contained in the generated MS/MS spectral data using an in-house version

**Table 1** Total phenolics, flavonoids, total anthocyanins and reducing power of *Hibiscus sabdariffa* extracts

Sample extract*	Total phenolics (gGAE/100g)	Flavonoids (gQE/100g)	Total anthocyanins (gCy-3-glu/100 g)	Reducing power (gAAE/100 g)
MWWE	2.996 ± 0.020 <sup>b</sup>	0.745 ± 0.090 <sup>a</sup>	0.279 ± 0.010 <sup>a</sup>	3.916 ± 0.030 <sup>a</sup>
MWAC80	3.734 ± 0.180 <sup>a</sup>	0.263 ± 0.020 <sup>c</sup>	0.160 ± 0.003 <sup>c</sup>	1.370 ± 0.070 <sup>c</sup>
MWME80	2.643 ± 0.060 <sup>c</sup>	0.479 ± 0.040 <sup>b</sup>	0.055 ± 0.003 <sup>c</sup>	0.678 ± 0.020 <sup>d</sup>
USWE	2.513 ± 0.020 <sup>c</sup>	0.712 ± 0.060 <sup>a</sup>	0.184 ± 0.005 <sup>b</sup>	3.352 ± 0.060 <sup>b</sup>
USAC80	3.080 ± 0.114 <sup>b</sup>	0.260 ± 0.020 <sup>c</sup>	0.123 ± 0.005 <sup>d</sup>	1.226 ± 0.100 <sup>c</sup>
USME80	1.978 ± 0.030 <sup>d</sup>	0.317 ± 0.030 <sup>c</sup>	0.029 ± 0.002 <sup>f</sup>	0.544 ± 0.060 <sup>d</sup>

\*MWWE: microwave aqueous extract, MWAC80: microwave acetone 80% extract, MWME80: microwave methanol 80% extract, USWE: ultrasound aqueous extract, USAC80: ultrasound acetone 80% extract, USME80: ultrasound methanol 80% extract

Means not sharing the same letter in each column are significantly different ( $P \leq 0.05$ )

of the Mascot search engine v2.3 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) against the Uniprot KB protein database ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). The option “mammalia” was selected as taxonomy restriction parameter.

### 2.11 Oxidative Stability

The oxidative stability of the emulsions incorporated by the previous extracts of *H. sabdariffa* was determined using a Metrom 743 Rancimat (Herisau, Switzerland) (ISO International Standard, 2006). A flow rate of 10 L/h stream of dry air was bubbled into 3 g samples maintained at 90 °C. Volatile oxidation products were carried through the detector chamber containing deionized water. The change in conductivity was measured and recorded. The increase in the latter was measured as a function of time until maximal change which reflects the induction period (IP). The test was carried out until the endpoints of all the samples were reached, with a maximum allowable limit of 48 h.

### 2.12 Statistical Analysis

All data are means ± SD of three measurements. Differences between groups were tested by an analysis of variance (ANOVA) using the STATISTICA software (5.5).  $P$  values ≤ 0.05 were considered significant.

## 3 Results and Discussion

### 3.1 Total Phenolics, Flavonoids, Anthocyanins and Reducing Power of *H. sabdariffa* Extracts

Table 1 shows the levels of phenolic compounds found in the extracts studied in the following decreasing order: 80% acetone > water > 80% methanol. This can be attributed to the difference in dielectric properties of solvents, suggest-

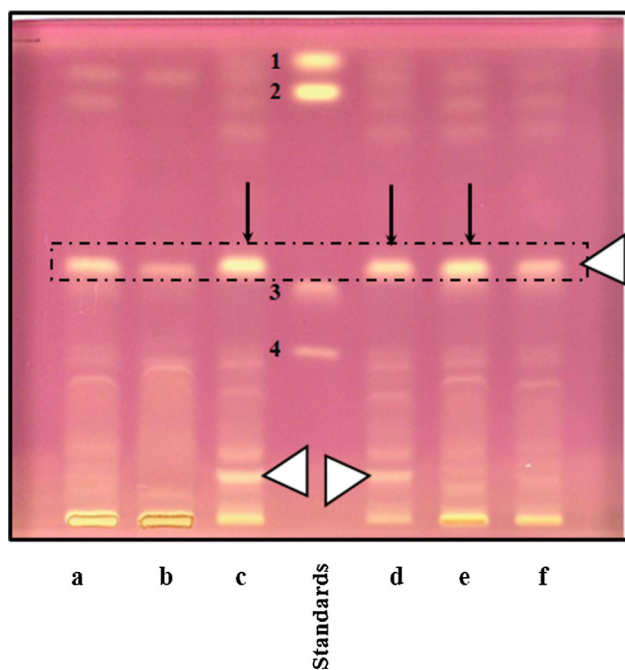
ing that phenolic compounds from *H. sabdariffa* were better extracted with the less polar solvent (80% acetone) than with its more polar counterparts (water and 80% methanol). These values were higher than those from [38] for water and 80% methanol decoctions.

Regarding flavonoids (Table 1), water and 80% acetone extracts depicted substantially similar contents for both microwave and ultrasound extraction techniques. On the other hand, the best contents of flavonoids for the 80% methanol extract were obtained for microwave extraction technique. It can be also noticed that, for the same extraction procedure, contents were higher using water as extractant. Most flavonoids of *H. sabdariffa* are glycosilated, which explains their enhanced affinity for polar solvents [39].

Flavonoids are known to be effective free radical scavengers. Because of their phenolic structure, these molecules possess sensitive sites to oxidation by free radicals. Furthermore, radicals from oxidation of flavonoids can undergo an electron delocalization through the psi of the double bonds system, thus becoming more stable radicals [40].

Something similar was found for anthocyanins, where the microwave extraction technique showed the highest contents for all the extracts compared to the ultrasound extraction technique, water extracts had the highest contents, followed by acetone 80% and methanol 80%, respectively. These findings were significantly higher than those obtained by [6], using a water decoction as an extraction technique of phenolic compounds. Authors suggested also that anthocyanins are the major contributors of antioxidant capacity.

Results of the reducing power of samples are summarized in Table 1. The reducing power of the aqueous extracts was higher than the 80% acetone and 80% methanol extracts, for both extraction techniques. These values were higher than those reported by [41] for water and 80% acetone decoctions. These findings are also in agreement with those of [42] since water is reported to be the best solvent for extraction of total phenolics and total anthocyanins and maximizes the extraction yields of antioxidants from *H. sabdariffa*.



**Fig. 2** HPTLC silica gel 60 developed with the TLC-DPPH method. The developing solvents were ethyl acetate/water/formic acid (85:15:10, v/v/v) after dipping in DPPH solution 0.2% (m/v) under white light illumination. (a) Aqueous extract obtained with microwave (MWWE), (b) aqueous extract obtained by ultrasound (USWE), (c) 80% methanolic extract obtained by microwave (MWME80), (d) 80% methanolic extract obtained by ultrasound (USME80), (e) 80% acetonic extract obtained by microwave (MWAC80) and (f) 80% acetonic extract obtained by ultrasound (USAC80). Standards: (1) rosmarinic acid, (2) quercetin, (3) chlorogenic acid and (4) rutin. The framed zone represents the most active fractions, and the black arrows show the extracts depicting the highest antioxidant activity

The increase in the solvent polarity boosts the extraction of phenolic compounds. The variation of antioxidants values in the extracts is due to the difference in extractant solvents [38].

Microwave-assisted extraction allows the increase in phenolic extraction yields and reduces extraction costs, by reducing treatment time and solvent consumption. It enables heating of solvent mixture, leading to the rupture of the plant tissue and release of the constituents into the solvent. Ultrasounds increase the surface contact area between the solid and liquid phases, causing a particle disruption [43].

The HPTLC-DPPH method measured the free radical-scavenging activity of *H. sabdariffa*'s fractions separated by HPTLC. The most active fractions observed were those with an  $R_f$  value of 0.40 (Fig. 2), where bright bands characterized the fractions possessing the highest radical-scavenging activity. It was also noticed that 80% methanolic extracts obtained by microwave and ultrasound techniques, along with 80% acetone extract obtained by microwave, had the brightest bands compared to the other extracts. This is not consistent with the reducing power activities detailed in Table 1, where

the highest values corresponded to the aqueous extracts using microwave and ultrasound processing. Reducing power, or the total reducing capacity, may serve as a significant indicator of potential antioxidants, able to take part in the electron transfer process. This method is more appropriate to determine the reducing activity of natural extracts [44].

### 3.2 HPTLC Screening of Phenolic Compounds

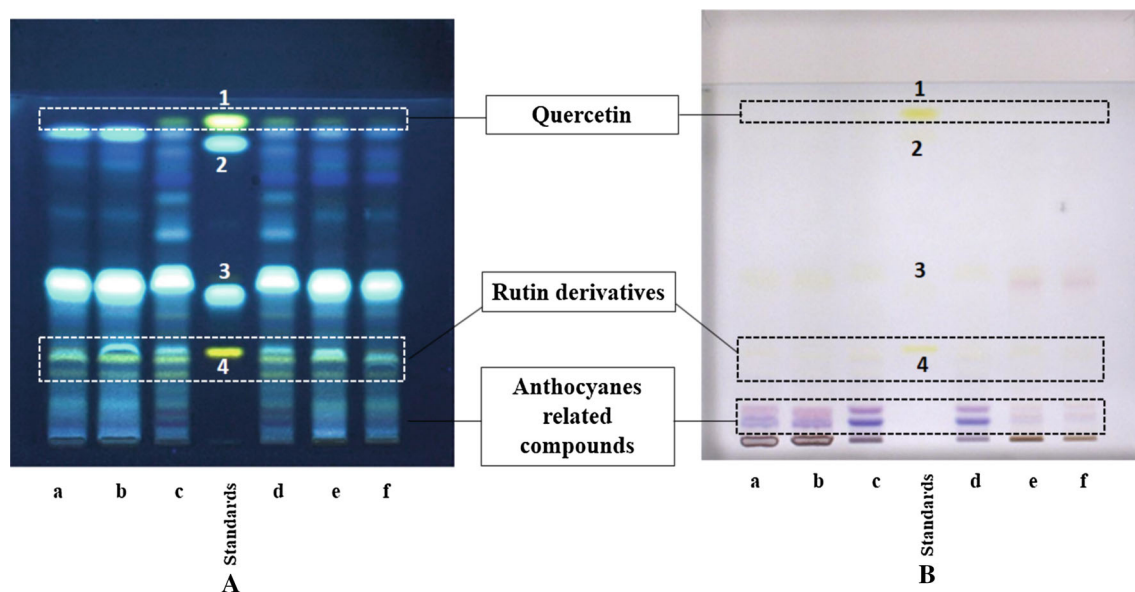
HPTLC screening of the selected crude extracts of *Hibiscus* samples (Fig. 3a, b) gave several bands. As we can see, differences among the extracts assayed were clear since the band intensities and their position greatly differ. These differences were mainly influenced by the nature of the solvents assayed finding similar trends in extracts a and b but both very different than samples c, d, e and f (all four very similar among them). Four standards were used to represent phenolic acids and flavonoids that were: quercetin (1), rosmarinic acid (2), chlorogenic acid (3) and rutin (4). According to their  $R_f$  values, some bands in the extracts c, d, e and f can be attributed likely to quercetin, and others have the same color as rutin, but have slightly different  $R_f$ s as compared to this standard. This likely due to the fact that these compounds could be rutin derivatives and/or have the same structure with some different acylated groups like sugar moieties (rutin being a flavonoid glycosilate). Interestingly, at the bottom of the plate (Fig. 3A, B), dimer-type bands for a, b, c, d, e and f extracts were clearly distinguished thanks to their red-purple color (Fig. 3A) and red-purple and blue intense bands in a, b, c, d extracts and slight reddish bands (Fig. 3B). Since there were no standards for anthocyanins available, we strongly believe that these bands are likely belonging to the family of anthocyanins.

It is reported, from the liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-Q-TOF-MS) analysis of the fractions and 70% methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*, the presence of phenolic acids (neochlorogenic acid, chlorogenic acid and cryptochlorogenic acid) and flavonoids (rutin, isoquercitrin, kaempferol-3-*o*-rutinoside and kaempferol-3-*o*-glucoside). These compounds are responsible for the antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* [13].

### 3.3 SDS-PAGE of Whey Proteins–Polyphenol Interactions

In our study, we were interested in investigating the possible interaction between the plant antioxidants incorporated in the aqueous phase with whey proteins occurring in the aqueous phase of the emulsion. This is of great interest since their availability expresses their antioxidant efficiency and protection against oxidation phenomena.

The whey spread emulsions incorporated with the following extracts: MWWE, USWE, MWAC80 and USAC80



**Fig. 3** HPTLC silica gel 60 developed with ethyl acetate/water/formic acid (85:15:10, v/v/v) under **A** 366 nm and **B** white light illumination. (a) Aqueous extract obtained with microwave (MWWE), (b) aqueous extract obtained by ultrasound (USWE), (c) 80% methanolic extract obtained by microwave (MWME80), (d) 80% methanolic extract

obtained by ultrasound (USME80), (e) 80% acetonetic extract obtained by microwave (MWAC80) and (f) 80% acetonetic extract obtained by ultrasound (USAC80). Standards: (1) rosmarinic acid, (2) quercetin, (3) chlorogenic acid and (4) rutin

have been chosen for the experiments, due to their highest reducing power (Table 1). The control emulsion (containing  $\alpha$ -tocopherol as antioxidant) and the previous emulsions contained a concentration of antioxidants equivalent to  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , as specified by the internal standards of the food company (CEVITAL SPA).

In this study, using electrophoresis technique, we report for the first time an interaction between whey proteins and polyphenols from *Hibiscus* extracts in a real food matrix. SDS-PAGE patterns (Fig. 4) of crude whey after heat treatment ( $70^\circ\text{C}/20 \text{ min}$ ) (lane 1), pure  $\beta$ -lactoglobulin (lane 2), aqueous phases after recovery from the whey spread emulsions by phase separation (E1, lane 3), (E2, lane 4), (E3, lane 5), (E4, lane 6) and (E5, lane 7). Ten  $\mu\text{g}$  of proteins for each sample was run in each well of the gel, and protein quantification was done using the Bradford method. The electrophoresis gel depicted in Fig. 4 was realized in triplicate, and a representative one was given. Molecular marker proteins from Bio-Rad were run in the same gels, and Un-Scan-It software was used for molecular weight calculation.

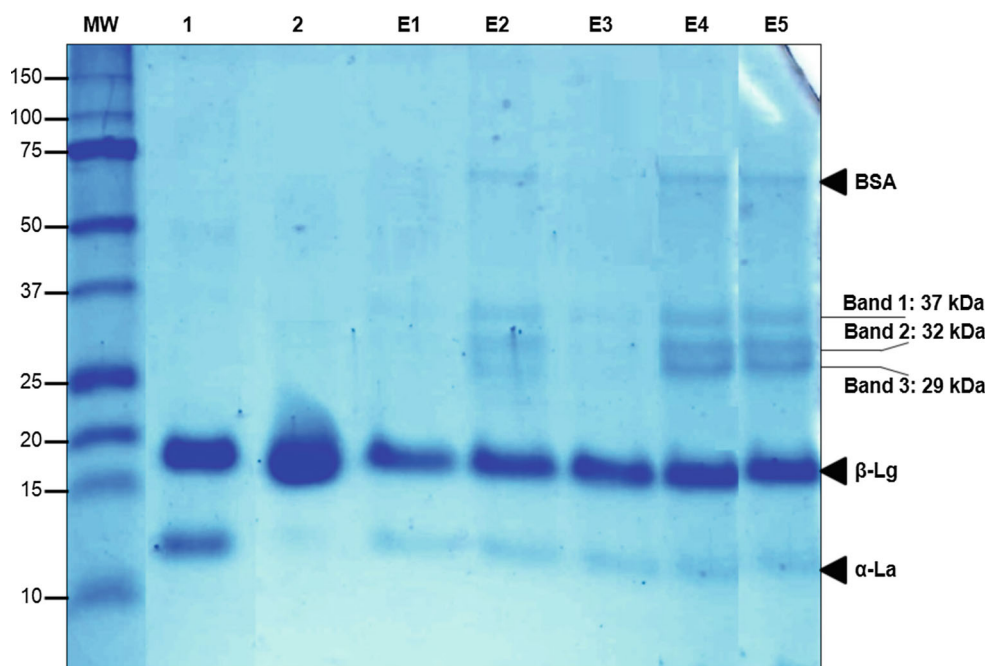
Being easily recognizable and confirmed by LC-ESI-MS/MS analysis,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin can be observed in all the lanes of the gel together with a weak intensity band referring to the bovine serum albumin. According to [45],  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumine represent the major whey proteins, but also a low amount of BSA is present. Caseins have been also detected in this study, due to the use of crude whey recovered from a cheese-making indus-

try. Some caseins, such as alpha s1-casein, are so minor that their revelation using Coomassie Blue was not possible. Also, their interactions with the polyphenols of *Hibiscus sabdariffa* were revealed after their position at higher Mw values in the gel.

Lanes from E2 to E5 show three bands with high (E4 and E5) and low (E2 and E3) intensities, forming a dimer (MWs of 29 and 32 kDa, respectively) and a single band with a molecular weight of 37 kDa. These bands are totally absent in E1, as the latter does not contain antioxidants (control emulsion). The band intensities in lanes E4 and E5 are more intense than those observed in lanes E2 and E3. As reported in Sect. 3.1, extracts of MWAC80 (E4) and USAC80 (E5) showed the best antioxidant activity (antiradical property) as compared to MWWE (E2) and USWE (E3), by the HPTLC-DPPH method. This is also supported by the results of total polyphenol contents (TPC) of the extracts (Table 1). Therefore, it can be assumed that the band intensities are related to the concentration of the polyphenols involved in the different complexes depicted (Fig. 4).

It was reported that the major polyphenols occurring in water and methanol extracts from *Hibiscus*, detected by HPLC and confirmed by LC/MS, are delphinidin 3-sambubioside, delphinidin 3-glucoside, cyanidin 3-sambubioside and cyanidin 3-glucoside [45].

As shown in Table 1, the four extracts incorporated in the spread emulsions contain anthocyanins. These compounds can contain from 2 to 3 hydroxyl groups in their B ring,



**Fig. 4** SDS-PAGE analysis for the study of whey proteins-polyphenols complexes of *Hibiscus sabdariffa*'s antioxidant extracts occurring in the aqueous phase of the whey spread emulsion. *Lanes:* (MW) standard proteins markers (values in kDa at left-hand side); (1) crude whey; (2)  $\beta$ -lactoglobulin pure standard; (E1) aqueous phase of control emulsion; (E2) aqueous phase incorporated with MWWE; (E3) aqueous

phase incorporated with USWE; (E4) aqueous phase incorporated with MWAC80; (E5) aqueous phase incorporated with USAC80. The black arrows show, respectively,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin (BSA). *Band 1* and *Bands 2, 3* (dimer in blue-purple) represent the whey protein-polyphenol complexes

which enable them to interact with other compounds, like proteins and peptides (Table 2).

These protein bands appeared due to the strong associations between the major whey proteins and some phenolic compounds present in the aqueous phase, as the bonds formed between these molecules must be of covalent nature and intermolecular cross-linking is more promoted [46]. Also, it suggests the possibility of such consequent covalent cross-linking, as a result of reactions at the free amino groups and tryptophan, so that *o*- or *p*-diphenols are oxidized to quinones, which react with lysin and tryptophan side chains in proteins [46].

Table 2 shows the results of LC-ESI-MS/MS sequencing data from the excised protein bands as shown in Fig. 4. It is clearly shown that the main proteins involved in the complex polyphenol-whey proteins for the dimer (bands 2 and 3) and the single band 1 are:  $\alpha$ -S1-casein,  $\beta$ -casein,  $\alpha$ -S2-casein,  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -S1-casein, as supported by the results of the peptide identification, protein sequence coverage and mascot scores. It can also be assumed that the differences in molecular weights for the band 1 (37 kDa) compared to bands 2 (32 kDa) and 3 (29 kDa) are possibly due to the type and number of the identified proteins:  $\alpha$ -S2-casein, which is the identified protein having a higher MW, was only found in band 1 (Fig. 4). Using reducing con-

ditions, as clearly shown by mass spectrometry technique, beta-lactoglobulin was found to interact with polyphenols in one band only (37 kDa). Another test (not shown herein) showed that when exposing whey proteins with an undenatured sample, the beta-lactoglobulin lacked to form any dimers.

As discussed above, the anthocyanins present in *Hibiscus* can interact with proteins and peptides mainly due to the occurrence, in the B ring of their skeleton, of hydroxyl groups. According to the findings of [47], flavonoids have a great affinity for the surface hydrophobic sites of proteins where they preferentially bind. Caseins appear to play a major role in the interactions observed with polyphenols (Table 2). Indeed, [48] reported that polyphenol-protein complexation is more hydrophobic than hydrophilic. Also the binding increases with the increase in OH groups in flavonoids.  $\beta$ -casein also forms stronger complexes with flavonoids than  $\alpha$ -casein, due to the more hydrophobic character of the former. Besides caseins, LC-ESI-MS/MS revealed also  $\beta$ -lactoglobulin to be involved in the band at 37 kDa, therefore interacting with polyphenols. [49] reported that the binding for  $\beta$ -lactoglobulin with polyphenols increases with the increase in OH groups and both hydrophobic and hydrophilic interactions are observed in the polyphenol- $\beta$ -lactoglobulin complexation.

**Table 2** LC-ESI-MS/MS sequencing data of protein bands extracted from 1-D SDS-PAGE analysis of the aqueous phase of the whey spread emulsion containing different antioxidant extracts of *Hibiscus sabdariffa*

Band number	Identified protein name	UniprotKB ID	Sequence coverage (%)	Theoretical MW (Da)/pI	Mascot score	Identified peptides positions	Identified peptide sequences
<i>Band 1 (37 kDa)</i>	A) Alpha-S2-casein [ <i>Bos taurus</i> ]	CASA2_BOVIN	35	26019/8.55	257	86–106	K.ITVDDKHYQKALNEINQFYQK.F
						92–106	K.HYQKALNEINQFYQK.F
						96–106	K.ALNEINQFYQK.F
						107–128	K.FPQYLQYLYQGPIVLPWDQVK.R
						153–164	K.TVDMESTEVFTK.K
						176–180	R.LNFLK.K
						189–196	K.FALPQYLK.T
						57–76	R.VYVEELKPTPEGDLEILLQK.W
						141–154	R.TPEVDDDEALEKFDK.A
						165–178	R.LSFNPTQLEEQCHI
<i>Band 2 (32 kDa)</i>	A) Alpha-S1-casein [ <i>Bos taurus</i> ]	CASA1_BOVIN	26	24529/5.30	141	38–49	R.FFVAPFPEVFGK.E
						106–115	R.YLGYLEQLLR.L
						119–134	K.YKVPQLEIVPNSAEER.L
						148–166	K.EPMIGVNQELAYFYPELFR.Q
						23–37	K.HQGLPQEVLENLLR.F
						38–49	R.FFVAPFPEVFGK.E
						106–115	R.YLGYLEQLLR.L
						119–134	K.YKVPQLEIVPNSAEER.L
						121–134	K.VPQLEIVPNSAEER.L
						140–166	K.EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR.Q
<i>Band 2 (32 kDa)</i>	B) Beta-casein [ <i>Bos taurus</i> ]	CASB_BOVIN	20	25107/4.85	82	148–166	K.EPMIGVNQELAYFYPELFR.Q
						64–83	K.IHPFAQTQSLVYPPFGPIP.N.S
						199–217	R.DMPIQAFLLYQEPVLPVVR.G
						218–224	R.GPFPPIV





**Table 2** continued

Band number	Identified protein name	UniprotKB ID	Sequence coverage (%)	Theoretical MW (Da)/pI	Mascot score	Identified peptides positions	Identified peptide sequences
Band 3 (29 kDa)	A) Alpha-S1-casein [ <i>Bos taurus</i> ]	CASA1_BOVIN	37	24529/5.30	144	38–49	R.FFVAPFPEVFGK.E
						38–57	R.FFVAPFPEVFGKEKVNELSK.D
						39–49	F.FVAPFPEVFGK.E
						106–115	R.YLGYLEQLLR.L
						119–134	K.YKVPQLEIVPNSAEER.L
						121–134	K.VPQLEIVPNSAEER.L
						148–166	K.EPMIGVNQELAYFYPELFR.Q
						44–63	K.KIEKFSSEEQQTDELQDK.I
						48–63	K.FQSEEQQTDELQDK.I
						192–217	K.AVYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVPR.G
199–217	R.DMPIQAFLLYQEPVLPVPR.G						
206–217	F.LLYQEPVLPVPR.G						
218–224	R.GPFPPIV.						
	B) Beta-casein [ <i>Bos taurus</i> ]	CASB_BOVIN	26	25107/4.85	85		

**Table 3** Assessment of oxidative stability of a spread-type emulsion developed with extracts of *Hibiscus sabdariffa* using the Rancimat method

Emulsion	Induction period (h)
Control emulsion (T)	21.76 ± 0.09 <sup>c</sup>
Emulsion + 100 ppm MWWE	22.32 ± 0.06 <sup>a</sup>
Emulsion + 100 ppm USWE	22.26 ± 0.03 <sup>a</sup>
Emulsion + 100 ppm MWAC80	22.10 ± 0.05 <sup>b</sup>
Emulsion + 100 ppm USAC80	21.72 ± 0.03 <sup>c</sup>

Means not sharing the same letter in each column are significantly different ( $P \leq 0.05$ )

Thanks to the results of Rancimat test, oxidative stability of the emulsions incorporated with the four above mentioned extracts was not affected by the formation of this type of complexation. As far as we know, this is the first report on the investigation of polyphenol–whey protein interactions as the study was conducted in a real food emulsion.

### 3.4 Oxidative Stability by the Rancimat Test

For the induction period determination, the samples were analyzed by Rancimat. The effect of the extracts studied on oxidative stability of the whey spread emulsion was evaluated by Rancimat equipment, and results are presented in Table 3. The aqueous extract obtained by microwave (MWWE) was found to be more effective in stabilizing the emulsion against oxidative deterioration (22.32 h) as compared to the control emulsion containing  $\alpha$ -Tocopherol as antioxidant (21.85 h) ( $\rho \leq 0.05$ ). This is strongly supported by the highest antioxidant activity, evaluated by measurement of the reducing power, of the MWWE extract. The lowest oxidative stability was recorded for the USAC80 (21.72 h), which is also explained by the lowest reducing power value for the latter (1.23 g AAE/100 g) compared to MWWE (3.92 gAAE/100g) ( $\rho \leq 0.05$ ). These extracts were added at a concentration of 100 ppm, as recognized by the internal standards of the food company (CEVITAL Spa). According to [50], the addition of antioxidants at low concentrations into the fat system is very important for its oxidative stability. Our findings concerning the oxidative stability induced by the use of several extracts of *Hibiscus sabdariffa* are higher than those found by [51] using *Opuntia ficus-indica* peel extract in a margarine type emulsion. This demonstrates the good strategy of using *Hibiscus* extracts as natural antioxidants in an emulsion. All the herbs could be used as a natural antioxidant to preserve the food system apart from providing other benefits and would be preferred over the synthetic antioxidants (like BHA) to minimize adverse effects on mankind [52].

## 4 Conclusion

The present study was designed to propose and encourage the use of *H. sabdariffa*'s antioxidants as preservatives in fat products containing a valuable by-product of cheese manufacturing: whey. Due to the potential occurrence of bioactive proteins and peptides in the latter, our aim was to study their interactions with the antioxidants recovered and highlight the impact of the oxidative stability of the final product. This is the first report on the study of such interaction in a real food matrix.

The use of unconventional techniques (microwave and ultrasound) for antioxidants' extraction improved the recovery of phenolics and yielded a good antioxidant activity as expressed by the reducing power and the HPTLC-DPPH method. This is of great interest, knowing the health benefits of these phytochemicals and their key role against oxidation in food preservation.

The formulation of whey spread emulsions at a pilot scale using extracts showing the best antioxidant activity showed remarkable performance on oxidative stability. Use of whey, a by-product from cheese-making, in the emulsions formulated revealed the occurrence of polyphenol–whey proteins complexes, as shown by LC-ESI-MS/MS analysis, mainly due to hydrophobic bindings for  $\alpha$  and  $\beta$ -caseins, but also both hydrophobic and hydrophilic bindings in case of  $\beta$ -lactoglobulin. This phenomena did not affect the oxidative stability of the emulsions designed, as supported by the results of Rancimat test. The interactions observed have a positive impact on maintaining the resistance of the final product to oxidation.

**Acknowledgements** Authors thank deeply the technical staff of 3BS Laboratory for their valuable assistance and help. Special thanks to CEVITAL SPA food industry for their heavy contribution to the achievement of the present study. Also, SAFILAT dairy food company at Constantine for generously donating whey and Research and Development supervisor Mrs. SEFARI Amel for her constant help and support. INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algeria for the financial support. Authors are also grateful for the financial support from the Slovenian Research Agency (P1-0005) and project AGL2012-32146 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for their valuable contribution.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Paul, H.: "*Hibiscus sabdariffa*" L. Paris 5 (1995)
- McClintock, N.; El Tahir, I.: *Hibiscus sabdariffa* L. PROTA 2 (2004)
- Hassan, B.H.; Hobani, A.I.: Flow properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. J. Food Eng. 35(4), 459–470 (1998). doi:10.1016/S0260-8774(98)00044-2



4. Endrias, A.: Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'*Hibiscus sabdariffa* L. et à l'*Artemisia annua* (2006)
5. Cisse, M.; Dornier, M.; Sakho, M.; Ndiaye, A.; Reynes, M.; Sock, O.: Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition et principales utilisations. *Fruits* **64**(03), 179–193 (2009)
6. Tsai, P.J.; Huang, H.P.; Huang, T.C.: Relationship between anthocyanin patterns and antioxidant capacity in mulberry wine during storage. *J. Food Qual.* **27**(6), 497–505 (2004)
7. Mendoza-Díaz, S.; Mendoza-Díaz, S.; del Carmen Ortiz-Valerio, M.; Castaño-Tostado, E.; de Dios Figueroa-Cárdenas, J.; Reynoso-Camacho, R.; Ramos-Gómez, M.; Campos-Vega, R.; Loarca-Piña, G.: Antioxidant capacity and antimutagenic activity of anthocyanin and carotenoid extracts from nixtamalized pigmented creole maize races (*Zea mays* L.). *Plant Foods Hum. Nutr.* **67**(4), 442–449 (2012)
8. Calligaris, S.; Manzocco, L.; Nicoli, M.C.: Modelling the temperature dependence of oxidation rate in water-in-oil emulsions stored at sub-zero temperatures. *Food Chem.* **101**(3), 1019–1024 (2007). doi:[10.1016/j.foodchem.2006.02.056](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.056)
9. St Angelo, A.J.: Lipid oxidation in food. In: ACS Symposium Series (USA). American Chemical Society (1992)
10. Sáyago-Ayerdi, S.G.; Arranz, S.; Serrano, J.; Goñi, I.: Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *J. Agric. Food Chem.* **55**(19), 7886–7890 (2007)
11. Bidie, A.; N'guessan, B.; Yapo, A.; N'guessan, J.; Djaman, A.: Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sci. Nat.* **8**(1–2), 1–12 (2013)
12. Gu, L.; Zheng, S.; Wu, T.; Chou, G.; Wang, Z.: High-performance thin-layer chromatographic–bioautographic method for the simultaneous determination of Magnolol and Honokiol in *Magnoliae officinalis* Cortex. *JPC-J. Plan. Chromatogr.-Mod. TLC* **27**(1), 5–10 (2014)
13. Wang, J.; Cao, X.; Qi, Y.; Ferchaud, V.; Chin, K.L.; Tang, F.: High-performance thin-layer chromatographic method for screening antioxidant compounds and discrimination of *Hibiscus sabdariffa* L. by principal component analysis. *J. Plan. Chromatogr.* **28**(4), 274–279 (2015)
14. Cieśla, Ł.; Kryszewski, J.; Stochmal, A.; Oleszek, W.; Waksmundzka-Hajnos, M.: Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **70**, 126–135 (2012)
15. Yrjönen, T.; Peiwu, L.; Summanen, J.; Hopia, A.; Vuorela, H.: Free radical-scavenging activity of phenolics by reversed-phase TLC. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**(1), 9–14 (2003). doi:[10.1007/s11746-003-0642-z](https://doi.org/10.1007/s11746-003-0642-z)
16. Azmir, J.; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M.M.; Sharif, K.M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M.H.A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N.A.N.; Omar, A.K.M.: Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng.* **117**(4), 426–436 (2013). doi:[10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014)
17. Li, Y.; Fabiano-Tixier, A.S.; Vian, M.A.; Chemat, F.: Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **47**, 1–11 (2013). doi:[10.1016/j.trac.2013.02.007](https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.02.007)
18. Vinatoru, M.: An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* **8**(3), 303–313 (2001). doi:[10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)
19. Liu, Q.; Cai, W.; Shao, X.: Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta* **77**(2), 679–683 (2008). doi:[10.1016/j.talanta.2008.07.011](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.011)
20. Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V.I.: A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**(4), 1821–1835 (2011). doi:[10.1016/j.foodchem.2010.12.026](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026)
21. Smithers, G.W.: Whey and whey proteins-from 'gutter-to-gold'. *Int. Dairy J.* **18**(7), 695–704 (2008)
22. Zall, R.R.: Sources and composition of whey and permeate. In: Zadow, J.G. (ed.) *Whey Lactose Process.*, pp. 1–72. Springer, Netherlands (1992)
23. Schanbacher, F.L.; Talhouk, R.S.; Murray, F.A.: Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livest. Prod. Sci.* **50**(1–2), 105–123 (1997). doi:[10.1016/S0301-6226\(97\)00082-1](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(97)00082-1)
24. Korhonen, H.; Pihlanto, A.: Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* **16**(9), 945–960 (2006). doi:[10.1016/j.idairyj.2005.10.012](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012)
25. Onwulata, C.; Huth, P.: *Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, vol. 82. Wiley, New Jersey (2009)
26. N, Keri Marshall: Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev.* **9**(2), 136–156 (2004)
27. Madureira, A.R.; Pereira, C.I.; Gomes, A.M.; Pintado, M.E.; Malcata, F.X.: Bovine whey proteins-overview on their main biological properties. *Food Res. Int.* **40**(10), 1197–1211 (2007)
28. Bryant, C.M.; McClements, D.J.: Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Technol.* **9**(4), 143–151 (1998). doi:[10.1016/S0924-2244\(98\)00031-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00031-4)
29. Farrag, A.: Emulsifying and foaming properties of whey protein concentrates in the presence of some carbohydrates. *Int. J. Dairy Sci.* **3**(1), 20–28 (2008)
30. Herceg, Z.; Režek, A.; Lelas, V.; Krešić, G.; Franetović, M.: Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. *J. Food Eng.* **79**(1), 279–286 (2007)
31. Dahmoune, F.; Boulekbache, L.; Moussi, K.; Aoun, O.; Spigno, G.; Madani, K.: Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Ind. Crops Prod.* **50**, 77–87 (2013). doi:[10.1016/j.indcrop.2013.07.013](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.013)
32. Dahmoune, F.; Spigno, G.; Moussi, K.; Remini, H.; Cherbal, A.; Madani, K.: *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Ind. Crops Prod.* **61**, 31–40 (2014). doi:[10.1016/j.indcrop.2014.06.035](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.035)
33. Gülçin, İ.; Oktay, M.; Kreççi, E.; Küfrevioğlu, Ö.: Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem.* **83**(3), 371–382 (2003). doi:[10.1016/S0308-8146\(03\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00098-0)
34. Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N.: Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* **97**(4), 654–660 (2006)
35. Lee, J.; Durst, R.W.; Wrolstad, R.E.: Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J. AOAC Int.* **88**(5), 1269–1278 (2005)
36. Simonovska, B.; Vovk, I.; Andrenšek, S.; Valentová, K.; Ulrichová, J.: Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *J. Chromatogr. A* **1016**(1), 89–98 (2003). doi:[10.1016/S0021-9673\(03\)01183-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01183-X)
37. Gagaoua, M.; Boucherba, N.; Bouanane-Darenfed, A.; Ziane, F.; Nait-Rabah, S.; Hafid, K.; Boudechicha, H.-R.: Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. *Sep. Purif. Technol.* **132**, 461–467 (2014). doi:[10.1016/j.seppur.2014.05.050](https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.05.050)
38. Mohd-Esa, N.; Hern, F.S.; Ismail, A.; Yee, C.L.: Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chem.* **122**(4), 1055–1060 (2010). doi:[10.1016/j.foodchem.2010.03.074](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.074)



39. Fernández-Arroyo, S.; Rodríguez-Medina, I.C.; Beltrán-Debón, R.; Pasini, F.; Joven, J.; Micol, V.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.: Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. *Food Res. Int.* **44**(5), 1490–1495 (2011). doi:[10.1016/j.foodres.2011.03.040](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.040)
40. Monserrat, J.-P.: Synthèse, caractérisation et criblage biologique de nouveaux dérivés ferrocéniques des flavonoïdes : chalcones, aurones, flavones et flavonols. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI (2011)
41. Sindi, H.A.; Marshall, L.J.; Morgan, M.R.A.: Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chem.* **164**, 23–29 (2014). doi:[10.1016/j.foodchem.2014.04.097](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.097)
42. Prenesti, E.; Berto, S.; Daniele, P.G.; Toso, S.: Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chem.* **100**(2), 433–438 (2007)
43. Acosta-Estrada, B.A.; Gutiérrez-Urbe, J.A.; Serna-Saldívar, S.O.: Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem.* **152**, 46–55 (2014)
44. Meir, S.; Kanner, J.; Akiri, B.; Philosoph-Hadas, S.: Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* **43**(7), 1813–1819 (1995). doi:[10.1021/jf00055a012](https://doi.org/10.1021/jf00055a012)
45. Albrecht, A.; Vovk, I.: Applicability of analytical and preparative monolithic columns to the separation and isolation of major whey proteins. *J. Chromatogr. A* **1227**, 210–218 (2012). doi:[10.1016/j.chroma.2012.01.011](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.011)
46. Rawel, H.; Kroll, J.; Hohl, U.: Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. *Food/Nahrung* **45**(2), 72–81 (2001)
47. Yuksel, Z.; Avci, E.; Erdem, Y.K.: Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chem.* **121**(2), 450–456 (2010). doi:[10.1016/j.foodchem.2009.12.064](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.064)
48. Hasni, I.; Bourassa, P.; Hamdani, S.; Samson, G.; Carpentier, R.; Tajmir-Riahi, H.-A.: Interaction of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins with tea polyphenols. *Food Chem.* **126**(2), 630–639 (2011). doi:[10.1016/j.foodchem.2010.11.087](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.087)
49. Kanakis, C.D.; Hasni, I.; Bourassa, P.; Tarantilis, P.A.; Polissiou, M.G.; Tajmir-Riahi, H.-A.: Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chem.* **127**(3), 1046–1055 (2011). doi:[10.1016/j.foodchem.2011.01.079](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.079)
50. Rios, M.S.; Santos, F.P.; Maia, F.N.; Mazzetto, S.: Evaluation of antioxidants on the thermo-oxidative stability of soybean biodiesel. *J. Therm. Anal. Calorim.* **112**(2), 921–927 (2013). doi:[10.1007/s10973-012-2650-6](https://doi.org/10.1007/s10973-012-2650-6)
51. Naima, R.; Oumam, M.; Hannache, H.; Sesbou, A.; Charrier, B.; Pizzi, A.; Charrier-El Bouhtoury, F.: Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. *Ind. Crops Prod.* **70**, 245–252 (2015). doi:[10.1016/j.indcrop.2015.03.016](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.016)
52. Pawar, N.; Gandhi, K.; Purohit, A.; Arora, S.; Singh, R.R.B.: Effect of added herb extracts on oxidative stability of ghee (butter oil) during accelerated oxidation condition. *J. Food Sci. Technol.* **51**(10), 2727–2733 (2014). doi:[10.1007/s13197-012-0781-1](https://doi.org/10.1007/s13197-012-0781-1)

# Stabilité oxydative et interactions protéine-polyphénols

Effet de l'extrait polyphénolique aqueux de *P. scoparius* dans une émulsion formulée à l'échelle laboratoire

## Introduction

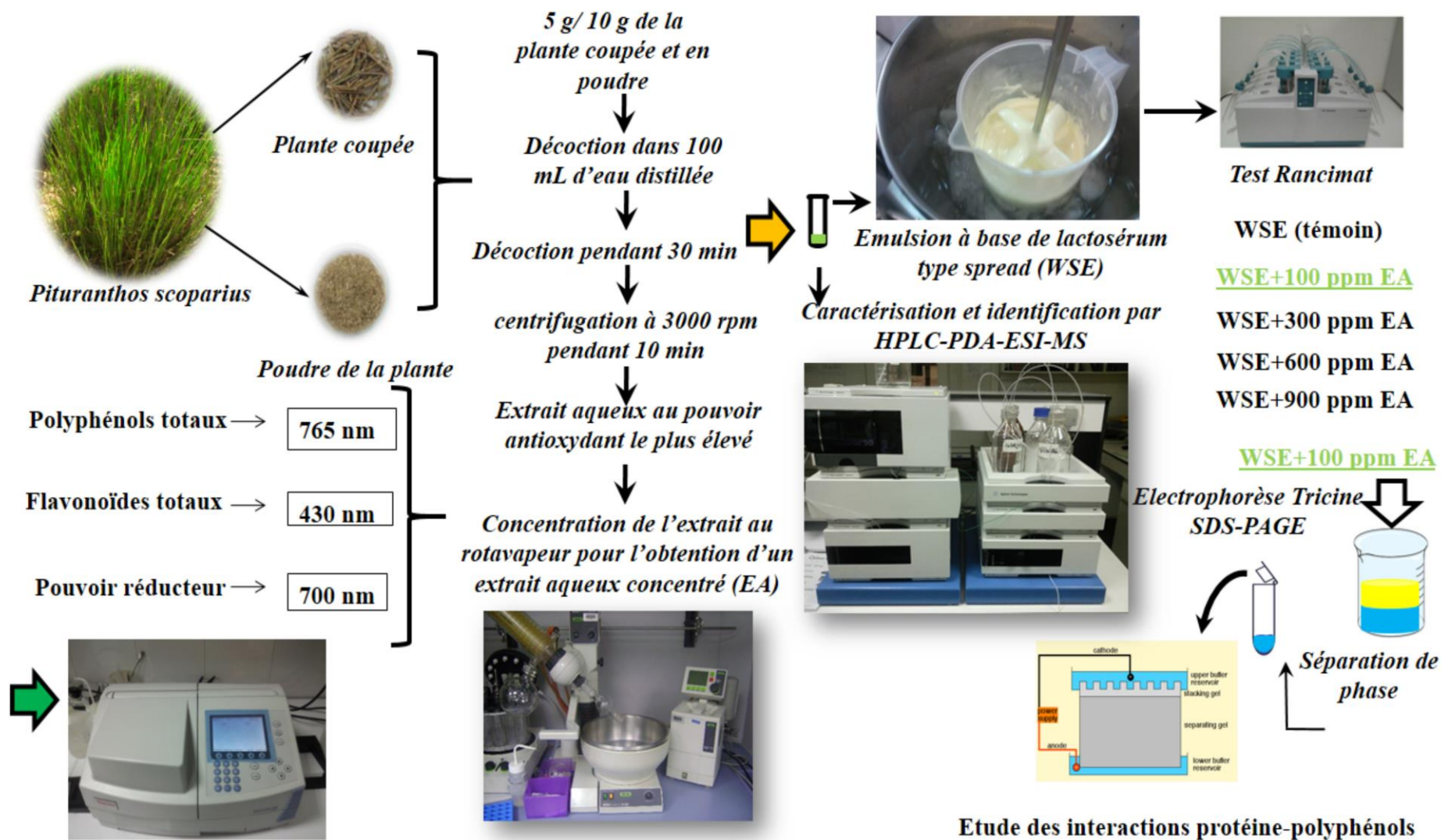
De nombreux produits alimentaires naturels et transformés sont à l'état d'émulsion, partiellement ou totalement, ou bien ont déjà existés pour un certain temps dans cet état (Di Mattia *et al.*, 2011). Si l'huile est la phase dispersée et l'eau étant la phase continue, alors l'émulsion est de type huile-dans-l'eau ou huile-eau (H/E ou encore oil/water, O/W), si par contre l'eau est la phase dispersée et l'huile la phase continue ou dispersante, alors l'émulsion est de type eau-dans-l'huile ou eau-huile (E/H ou encore water/oil, W/O) (Phillips *et al.*, 1994). L'évaluation de l'effet des antioxydants employés dans les huiles et les émulsions alimentaires est rendue délicate, si on prend en considération les phénomènes complexes qui prennent place au niveau des interfaces entre phases. Ils dépendent surtout de l'affinité de ces antioxydants et leurs actions au niveau des interfaces air-huile (cas des huiles végétales) et E/H ou H/E (cas des émulsions (Frankel *et al.*, 1994). Par conséquent, l'efficacité de ces antioxydants sur la peroxydation des lipides est intimement dépendante de l'état physique du substrat d'oxydation (phases continues ou dispersées) (Bondet *et al.*, 2000). Dans ce cas particulier, le paradoxe polaire est le paramètre le plus important à tenir en compte qui affecte les polyphénols dans un milieu aussi hétérogène que les émulsions (Cuvelier *et al.*, 2000).

Le lactosérum a été longtemps défini comme un sous-produit de l'industrie fromagère et a été considéré, des années durant, comme un déchet par les producteurs fromagers et une composante de la chaîne de production dévaluée et réputée d'aucun intérêt économique. De nos jours, cette idée a été complètement écartée et le lactosérum a regagné un intérêt incommensurable auprès des technologues alimentaires. Dans ce contexte, le lactosérum est considéré comme une source relativement peu coûteuse pour les protéines à haute qualité nutritionnelle pour des usages en aliments fonctionnels. Ceci permet de considérer le lactosérum plus comme un coproduit de l'industrie fromagère plutôt qu'un sous-produit abondant des industries fromagères (Walzem *et al.*, 2002 ; Luhovyy *et al.*, 2007). Les protéines du lactosérum font partie du groupe des protéines laitières qui contiennent plusieurs protéines dont les suivantes :  $\beta$ -Lactoglobuline ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -Lactalbumine ( $\alpha$ -LA), sérum albumine (SA), Immunoglobulines (Ig), Lactoferrine (LF) et les fractions protéase-peptones (Farrell *et al.*, 2004). Il est rapporté qu'une quantité équivalente à 700,000 tonnes de protéines de lactosérum est à disposition pour utilisation comme ingrédients alimentaires de valeur, dont 62% est fructueusement exploitée en industrie agroalimentaire (de Wit, 1998).

*Pituranthos scoparius* est une plante aromatique largement distribuée dans le Sahara septentrional algérien, caractérisée morphologiquement par de nombreuses ramifications pour

les tiges. Les feuilles sont presque inexistantes et les fruits sont de très petite taille (Belgacem *et al.*, 2016). Elle est dite « Guezzah » ou « Tattayt » par les populations autochtones en Algérie et est traditionnellement employée dans le traitement d'un bon nombre de maladies dont la fièvre, l'asthme, l'hépatite et rhumatisme. Quelques activités biologiques constatées pour cette plante sont associées à la présence d'isocoumarines alkylées (Hamada *et al.*, 2004).

L'objectif principal de cette recherche est l'investigation de l'incorporation d'un extrait aqueux concentré de *P. scoparius* dans une émulsion eau dans l'huile (W/O) de type spread à base de lactosérum. Comme pour les travaux précédents (**Publications n° 1 et 2**), deux principaux objectifs sont ciblés : la valorisation du lactosérum issu d'une laiterie-fromagerie locale (SAFILAIT SPA, Constantine) et la valorisation de l'extrait aqueux de la plante *P. scoparius* dans une formulation alimentaire, afin de mimer l'usage traditionnel de l'extrait aqueux de la plante. Des dosages spectrophotométriques sont entrepris pour évaluer les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et pouvoir réducteur. Une caractérisation chromatographique par HPLC-PDA-ESI-MS pour établir son profil phytochimique. L'incorporation de l'extrait aqueux à différentes concentrations progressives (100, 300, 600 et 900 ppm) dans l'émulsion à l'échelle laboratoire a pour objectif d'étudier la stabilité oxydative de celle-ci par une oxydation forcée (test Rancimat). Enfin, une étude des interactions entre les protéines du lactosérum de la phase aqueuse et les polyphénols de *P. scoparius*. Une électrophorèse Tricine SDS-PAGE a été appliquée pour l'étude de ces interactions, après récupération de la phase aqueuse, suivie par une analyse densitométrique sur le gel développé. Un schéma général de l'étude réalisée est présenté en Figure 31.



**Figure 31** : schéma général de l'incorporation de l'extrait aqueux concentré de *P. scoparius* dans une émulsion à base de lactosérum type spread. WSE : émulsion à base de lactosérum type spread; EA: extrait aqueux concentré.



**Aqueous extract of *Pituranthos scoparius* as a biopreservative against lipid oxidation of an emulsion and use of SDS-PAGE to asses protein-polyphenols interactions**

Chikhouné A., Križman M., Pavlica J.D., Shashkov M., Berroua Z., Chebbi K., Zeroual B., Aliane K., Hadjal S., Tounsi A., Boudjellal A. et Gagaoua M.  
Publié dans *Journal of Integrative Food, Nutrition and Metabolism* (2018) 5 (4): 1 – 6.

---

**Résumé**

En continuité des travaux réalisés sur la valorisation des molécules bioactives extraites à partir de *Pituranthos scoparius*, cette étude s'inscrit dans une dynamique d'exploitation à la fois du patrimoine végétal usité dans la pharmacopée traditionnelle algérienne mais aussi le lactosérum d'une fromagerie locale. Des décoctions aqueuses de 5 et 10% de la plante *P. scoparius*, réduite en poudre et coupées en petits morceaux, sont étudiées. L'extrait à 10% de poudre de la plante a montré la teneur la plus élevée en polyphénols totaux (4,39%), alors que le pouvoir réducteur le plus élevé a été obtenu pour l'extrait à 5% de la poudre de la plante (2,07%) ( $p < 0,05$ ). Le profil phytochimique de ce dernier a été caractérisé par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation en électrospray et détection par barrette de photodiode (HPLC-ESI-PDA-MS). Ce couplage a permis la caractérisation, l'identification et la quantification d'acides phénoliques et de flavonoïdes, dont l'acide chlorogénique (acide 5-*O*-cafféoylquinique) est le composé majoritaire. Le test de formulation de l'émulsion type spread à base de lactosérum à l'échelle laboratoire, incorporée de l'extrait concentré au pouvoir réducteur le plus élevé à différentes concentrations (100, 300, 600 et 900 ppm), a été réalisé et les émulsions ont été étudiées pour leurs stabilités oxydatives par Rancimat. Le spread incorporé à 300 ppm de l'extrait aqueux concentré a montré la meilleure résistance à l'oxydation forcée (16,53 h). En outre, une analyse électrophorétique par Tricine SDS-PAGE a été effectuée sur la phase aqueuse du spread incorporé à 100 ppm de l'extrait aqueux concentré, afin d'étudier les interactions protéine-polyphénols pouvant avoir lieu au sein des spread formulés. Cette technique a permis l'observation de la formation d'un dimère caractéristique de couleur rouge pourpre, avec des poids moléculaires compris entre 30,3 et 32,4 kDa. L'analyse densitométrique a révélée également que les interactions des polyphénols de *P. scoparius* avec les protéines de la phase aqueuse sont spécifiques pour des poids moléculaire élevés (> 40 kDa) et de faibles poids moléculaires. De même que pour les études précédentes, la formation de ce dimère n'a pas affecté la stabilité oxydative du spread correspondant. Cette étude démontre ainsi que l'utilisation de l'extrait aqueux de *P. scoparius* est une alternative attractive pour l'industrie des corps gras, qui est en quête perpétuelle pour limiter ou abolir l'utilisation des antioxydants synthétiques.

---

**Mots clés :** *Pituranthos scoparius* ; polyphénols ; émulsion; spread ; stabilité oxydative ; interactions protéine-polyphénols.

# Aqueous extract of *Pituranthos scoparius* as a biopreservative against lipid oxidation of an emulsion and use of SDS-PAGE to study protein-polyphenols interactions

Anis Chikhoune<sup>1\*</sup>, Mitja Krizman<sup>2</sup>, Zahra Berroua<sup>3</sup>, Kaissa Chebbi<sup>3</sup>, Brahim Zeroual<sup>4</sup>, Khellaf Aliane<sup>4</sup>, Samir Hadjal<sup>4</sup>, Abderrahmane Tounsi<sup>4</sup>, Abdelghani Boudjellal<sup>1</sup> and Mohammed Gagaoua<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Equipe Maquav, Laboratoire BIOQUAL, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, 7e km Route de Sétif, 25000 Constantine, Algeria

<sup>2</sup>National Institute of Chemistry, Department of Food Chemistry, Hajdrihova 19, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>3</sup>Département des Technologies Alimentaires, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, 7e Km Route de Sétif, 25000 Constantine, Algeria

<sup>4</sup>Cévital spa, nouveau quai, port de Bejaia, BP 334, Bejaia 06000, Algeria

<sup>5</sup>Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

## Abstract

In this work, aqueous decoctions with 5% and 10% cut and powder plant materials of *Pituranthos scoparius* were investigated. The best result for the total phenolic extracts was 4.39% ( $\pm 0.05$ ) for the 10% powder plant material extract, whereas the best reducing power was obtained for 5% powder plant material extract with a mean value of 2.07% ( $\pm 0.06$ ). The phytochemical profile of the polyphenol extract was characterized by the presence of chlorogenic acid as a major constituent. Oxidative stability by Rancimat test showed that all the formulations incorporated with the concentrated aqueous extract showed better resistance to oxidation than the control formulation. Moreover, Tricine SDS-PAGE electrophoresis was used to assess protein-polyphenols interactions within the aqueous phase. This efficient technique allowed revealing the formation of a characteristic dimer with molecular weights ranging from 30.3 to 32.4 kDa. Densitometric analysis allowed further to highlight the specificity of the interactions within the whey protein at high (>40 kDa) and low molecular weight. The findings of this study, showed that the polyphenolic extract of *Pituranthos scoparius* offers an attracting alternative for fat products as a natural biopreservative instead of the regular synthetic antioxidants used in food industry.

## Introduction

Many natural and processed food products are in an emulsion state, totally or partially, or existed, for a time, in this state [1]. If oil is the dispersed phase and water is the continuous phase, the emulsion is an oil-in-water type or oil-water, whereas if water is the dispersed phase and oil the continuous phase, the emulsion is a water-in-oil type or water-oil [2]. The complex interfacial phenomena taking part in oils and food emulsions makes it difficult to evaluate the efficiency of the antioxidants employed, as the latter is depending on the affinity of antioxidants and their action in the air-oil (bulk oils) and the water-oil (emulsions) interfaces [3]. Therefore, the effectiveness of these antioxidants on lipid peroxidation is intimately depending on the physical state of the substrate (continuous or dispersed phases) [4]. Thereby, in this particular case, the polar paradox is the strongest parameter affecting the efficiency of phenolic antioxidants in a dispersed medium [5].

Whey was traditionally defined as a by-product of cheese-making and considered for years as a waste by the cheese producers, with little or even no commercial value. Nowadays, this idea is totally vanished as whey is gaining greater interest for food technologists. In this context, whey is regarded as an inexpensive source of high nutritional quality protein for uses as a physiologically functional food ingredient. This allows to consider whey as a co-product of cheese-making rather than an abundant by-product of cheese food industries [6,7]. Whey proteins in the group of milk proteins contains numerous protein entities such as  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -La), serum albumin (SA), Immunoglobulins (Ig), Lactoferrin (LF) and protease-peptone fractions

[8]. A source of about 700,000 tons of whey proteins is available for use as valuable food ingredients, of which about 62 % appears to be gainfully utilized [9]. For example, whey proteins are often used to improve food products because of their high nutritional quality and their versatile functional properties [10].

*Pituranthos scoparius* is an aromatic widespread plant found mainly in the septentrional Sahara in Algeria and is characterized morphologically by high ramifications for stems. The leaves are almost inexistent and the fruits are very small [11]. It is spelled by the autochthonous people in Algeria by the name of "Guezzah" or "Tataytt" and is traditionally used in treating successfully numerous diseases such as fevers, asthma, hepatitis and rheumatism. Some of the interesting biological activities observed are connected to the presence of alkylated isocoumarins [12].

\*Correspondence to: Mohammed Gagaoua, Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France, E-mail: gmber2001@yahoo.fr; mohammed.gagaoua@inra.fr

Anis Chikhoune, Equipe Maquav, Laboratoire BIOQUAL, INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, 7e km Route de Sétif, 25000 Constantine, Algeria, E-mail: anis.chikhoune@gmail.com; chikhoune.anis@umc.edu.dz

**Key words:** emulsion, antioxidants, whey proteins, protein-polyphenols interactions, oxidative stability

**Received:** June 25, 2018; **Accepted:** July 18, 2018; **Published:** July 23, 2018

From what was mentioned above, this study aimed to investigate the oxidative stability of a whey spread emulsion produced at a laboratory scale, incorporated with natural antioxidants from an aqueous extract, obtained by decoction of *P. scoparius*, at concentrations of 100, 300, 600, and 900 ppm, using a Rancimat test. Furthermore, the interactions between these antioxidants and whey proteins were assessed by the means of Tricine SDS-PAGE followed by Densitometric analysis.

## Materials and methods

### Materials

Refined, bleached and deodorized oils: palm oil (PO), sunflower oil (SFO) and soybean oil (SBO) were obtained from a local refinery (CEVITAL SPA, Bejaia, Algeria). The emulsifier mono lactic acid was purchased from Palsgaard (Denmark) and Anatto Curcumin as a colorant from Global Entreprise (Switzerland). Deionized water, salt and pasteurized milk were from the local refinery CEVITAL Spa (Bejaia, Algeria).

The pasteurized liquid whey, recovered from a cheese-making process is generously donated by SARL SAFILAI Company (Ali Mendjli, Constantine, Algeria). All these ingredients are of food grade.

The standards of Gallic acid ( $\geq 99\%$ ), Quercetin ( $\geq 98\%$ ) and Ascorbic acid ( $\geq 99\%$ ) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The reagent Folin-Ciocalteu was supplied by Merck (Darmstadt, Germany) and the remaining reagents and solvents were all of analytical grade.

Aerial parts (stems and leaves) of *Pituranthos scoparius* were collected from the location of Sedrata, Souk Ahras city situated in the Northeast of Algeria. The samples were collected in April 2013. Plant aerial parts were dried at room temperature, a part of the samples was cut into small pieces, and the other dried parts were reduced into powder.

### Preparation of the aqueous extracts

The plant extracts of *Pituranthos scoparius* were obtained using aqueous decoctions at 5 and 10%. The decoctions were made with two forms of the plant material: plant material cut into small pieces and ground plant material into a fine powder. The use of the cut plant material was guided by the traditional use in folk medicine of the whole plant of *Pituranthos* in the preparation of the decoctions. Due to its fibrous nature, it was difficult to get a finer powder by simply grinding it with a regular grinder. Therefore, we used a wooden coffee grinder (Alexanderwerk, Germany) to improve the grinding of the plant material. Amounts of 5 g and 10 g respectively of the cut and powder materials were prepared in 100 mL of distilled water, under boiling for 30 min. The extracts were then filtered using a Whatman paper filter and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatants were then stored at 4°C until analysis.

### Determination of total phenolic content

The total phenolic contents of the extract were determined according to Gülçin *et al.* [13], with slight modifications. Briefly, 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (1:10, v/v) was added to 200  $\mu$ L of each extract. After 3 min, 800  $\mu$ L of sodium carbonate solution (7.5%; m/v) was added. The tubes were placed in darkness for 30 min and the absorbance was recorded at 725 nm against a blank. The results were expressed in g of Gallic Acid Equivalents (GAE) per 100 g dry weight (DW).

### Estimation of flavonoid content

The flavonoid content was determined according to Djeridane *et al.* [14], with slight modifications. Briefly, 1 mL of each sample extract was mixed with 1 mL of 2% aluminum chloride solution. After incubation at room temperature for 15 min, the absorbance of the reaction mixture was measured at 430 nm and the flavonoid content was expressed in g Quercetine Equivalents (QE) per 100 g dry weight (DW).

### Antioxidant activity by the reducing power

The method described by Gülçin *et al.* [13] was used to determine the reducing power of the extracts. An approximate of 200  $\mu$ L of the extract samples were mixed with sodium phosphate buffer (pH 6.6, 0.2 M) and potassium ferricyanide (1%, w/v). The mixture was incubated at 50°C for 20 min, and 250  $\mu$ L of trichloroacetic acid (10%, w/v) was added together with distilled water (1.0 mL) and 200  $\mu$ L ferric chloride (0.1%, w/v). The absorbance was measured at 700 nm using ascorbic acid as a standard, and the results were expressed as ascorbic acid equivalents (AAE) per 100 g dry weight (DW).

### HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the phenolic compounds

The extract showing the best reducing power, namely the 5% powder plant material obtained by aqueous decoction was selected for the incorporation in the whey spread emulsion. Before this, it was first characterized for its phenolic compounds. The analysis was performed using a Thermo Accela 600 HPLC system loading an auto-sampler/injector, vacuum degasser, quaternary pump and coupled to a photodiode array UV-VIS detector (PDA) and a Thermo triple quadrupole (TSQ) mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) source operating in negative ionization mode (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA).

The Chromatographic separation of metabolites was achieved through a 50 mm $\times$ 2.1 i.d. mm, 2.6  $\mu$ m particle size Kinetex XB-C18 column from Phenomenex (Phenomenex Inc. Torrance, CA, USA). The separation conditions were as follow: mobile phase A, water with 0.1 % FA; mobile phase B, ACN with 0.1% FA. The elution gradient in %B started at 5%, increased at 20% in 20 min, raised at 30% at 20.1 min and kept for 5 and 6 min for column cleaning and equilibration, respectively. Column temperature, flow-rate and injection volume were 22 °C, 300  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> and 5  $\mu$ L, respectively. Quantitative UV-Vis detection was performed at 330 nm and qualitative MS analysis was featured in the m/z range of 340-650 considering multiple reaction monitoring (MRM) transitions detailed by [15]. The analytical device was controlled by a PC loading by the means of Thermo Xcalibur v. 2.1.0 software, which was also used for data processing.

### Tricine SDS-PAGE analysis of whey proteins and protein-polyphenols interactions

For protein-polyphenols interactions study and the assessment of quality of the proteins of the recovered whey, the protocol recently described by our group [16,17] and based on Tricine SDS-PAGE technique, was exactly used.

### Preparation of the whey spread emulsion incorporated with the antioxidant aqueous extract of *P. scoparius*

Emulsions were prepared at a laboratory scale, following the same preparation procedure reported in our earlier work [18]. The aqueous extract of 5% powder plant material, exhibiting the best reducing power was selected for its incorporation in the emulsions. Thus, the

extract was first concentrated by evaporation in a rotavapor (Heidolph, Germany) at 40°C, prior its incorporation at concentrations of 100, 300, 600, and 900 ppm.

### Oxidative stability

The oxidative stability was assessed according to the ISO 6886 standard and our recently described procedure [18].

### Statistical analysis

Data of spectrophotometry are means ±SD of three measurements. Results of HPLC-MS determinations are means ±SD of five measurements. Results of Rancimat are means ±SD of two measurements. Differences between groups were tested by variance analysis (ANOVA) using STATISTICA software (7.0) and values were considered significant at  $P$ -values ≤ 0.05.

## Results and discussion

### Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of *P. scoparius* extracts

The total phenolic content, flavonoid content and reducing power of aqueous extracts, obtained from decoctions of cut plant material and powder plant material at respectively 5 and 10 %, are given in Table 1. As expected, the amount of the plant material and the cut or powder forms had significant effects on the total phenolic content ( $P$  ≤ 0.05). The highest content of total phenolics was obtained for the 10% aqueous extract of the powdered material (4.39%) and the lowest content for the 5% cut plant material (1.64%). The increase of the amount of the powder plant material allowed to get a higher content for phenolics ( $P$  ≤ 0.05). On another hand, the highest flavonoid content was obtained for the 5% cut plant material (2.03%) whereas the lowest content was obtained for the powder plant material (0.90%) ( $P$  ≤ 0.05). It is worth to note that the increase of the amount of the powder plant material did not increase the flavonoid content, as it was observed in the case of total phenolics (Table 1).

The reducing power of the extracts of *P. scoparius* are depicted in Table 1. The findings showed that the reducing power of the aqueous extracts were affected by the amount and form of the plant material ( $P$  ≤ 0.05). The highest value was obtained for the 5% powder plant material (2.07%) and the lowest content was obtained for the 10% cut plant material (0.50%) ( $P$  ≤ 0.05).

### Phytochemical profile of the extract by HPLC-DAD-ESI-MS analysis

The qualitative and quantitative phytochemical profile was carried out on the previously selected extract of *P. scoparius* (to be incorporated

**Table 1.** Total phenolic (TPC), total flavonoid (TFC) contents and reducing power (RP) of the aqueous decoctions of *P. scoparius* studied

Plant material	TPC <sup>1</sup>	TFC <sup>2</sup>	RP <sup>3</sup>
Powder plant material 5 %	2.41±0.12 <sup>c</sup>	1.04±0.06 <sup>b</sup>	2.07±0.04 <sup>a</sup>
Powder plant material 10 %	4.39±0.05 <sup>a</sup>	0.90±0.01 <sup>b</sup>	1.74±0.02 <sup>b</sup>
Cut plant material 5 %	1.64±0.09 <sup>d</sup>	1.20±0.03 <sup>b</sup>	0.85±0.02 <sup>c</sup>
Cut plant material 10 %	2.95±0.04 <sup>b</sup>	2.03±0.33 <sup>a</sup>	0.50±0.01 <sup>d</sup>

Means not sharing the same letter in the same column are significantly different ( $P$  ≤ 0.05).

<sup>1</sup>Total phenolic contents are expressed as gallic acid equivalents; grams of gallic acid per 100 g of dry weight (g GAE/100 g dry weight).

<sup>2</sup>Total Flavonoid contents are expressed as quercetin equivalents; grams of quercetin per 100 g of dry weight (g QE/100 g dry weight).

<sup>3</sup>Reducing power expressed as ascorbic acid equivalents; grams of ascorbic acid per 100 g of dry weight (g AAE/100 g dry weight).

**Table 2.** Phenolic compounds identified in the aqueous extract of *P. scoparius*

Compound	MS parent ion (m/z)	Aqueous extract <sup>1</sup>
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	353	15.44±0.14 <sup>e</sup>
5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	353	470.1±4.37 <sup>a</sup>
4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	353	16.56±0.15 <sup>e</sup>
Unknown peak	367	69.01±0.64 <sup>e</sup>
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside	609	74.83±0.70 <sup>b</sup>
Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	477	70.91±0.66 <sup>e</sup>
Unknown peak	491	23.02±0.21 <sup>d</sup>

Means sharing the same letters in the column are not significantly different ( $P$  ≤ 0.05).  
<sup>1</sup>The values are the mean±standard deviation of 5 replicates and expressed as mg equivalents of chlorogenic acid/100g dry weight.

in the emulsion). The results of the HPLC-DAD-ESI-MS system are depicted in Table 2 showing different separated and identified constituents, with known and unknown peaks. The compound identified as 5-*O*-Caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) is by far the major compound in the extract, depicting the highest content (470.13 mg CAE.100 g<sup>-1</sup> dry weight) ( $P$  ≤ 0.05). The two other phenolic acids, 3-*O*-Caffeoylquinic and 4-*O*-Caffeoylquinic, were the less abundant compounds in the extract compared to chlorogenic acid ( $P$  ≤ 0.05). Flavonoids are also present and were identified as Quercetin-3-*O*-rutinoside and Quercetin-3-*O*-glucuronide, respectively. Their contents are lower than chlorogenic acid by an order of magnitude of 6 ( $P$  ≤ 0.05). The contents of the present work are much higher than those reported by Dahia *et al.* [19]. Indeed, the authors reported also a higher content of chlorogenic acid compared to the rest of constituents mainly represented by flavonoids.

From these findings, it can be emphasized that a chromatographic method is suitable for the extracts of *P. scoparius* to shed light on the other compounds present in the extract. Being a simple polyphenolic ester antioxidant and highly bioavailable, chlorogenic acid is recognized as an effective and protective agent in animals against some neurodegenerative diseases [20]. Moreover, its high antioxidant potential is more accessible than many of the flavonoids known as effective radical scavengers [21].

### Oxidative stability by the Rancimat methods

The induction periods (IP) of the whey spread emulsions added by the concentrated aqueous extract of 5% cut plant material for every concentration of incorporation used (100, 300, 600, and 900 ppm) as assessed by the Rancimat test were listed in Table 3. The aqueous extract was found to be more effective in stabilizing the emulsion against oxidative deterioration, compared to the control emulsion containing α-Tocopherol as antioxidant. All the concentrations studied exhibited higher IP than the control ( $P$  ≤ 0.05) with an average of 14.40 h. For a concentration of 300 ppm, the emulsion gave an IP of 16.53 h, higher than all the other concentrations ( $P$  ≤ 0.05). These findings are in agreement with those reported previously by our group [18], using the essential oil of *P. scoparius* as a food preservative. A similar study conducted to investigate the protective effect of three aromatic herbs on the oxidative stability of an oil-in-water emulsion demonstrated the antioxidant properties of the herbs studied and their positive effect in delaying oxidation. Hence, they can be considered as natural antioxidant green alternatives to synthetic antioxidants in food preservation [22].

According to an earlier study, Rancimat method allows the prediction of sunflower oil's shelf life incorporated by a polyphenolic extract from sage, based on the assessment of the oxidative stability induced in the fat matrix [23]. The concentrations of the sage extract (1200 and 1500 ppm) providing a protective effect on oxidation

**Table 3.** Parameters of the oxidative stability of the whey spread emulsion incorporated with different concentrations of the aqueous extract of *P. scoparius*

Antioxidant	Concentration (mg kg <sup>-1</sup> )	Induction period (hours) <sup>1</sup>
WSE*+α-Tocopherol	100	14.40±0.02 <sup>c</sup>
WSE+AEPS**	100	16.31±0.03 <sup>b</sup>
WSE+AEPS	300	16.53±0.04 <sup>a</sup>
WSE+AEPS	600	14.93±0.04 <sup>d</sup>
WSE+AEPS	900	15.60±0.03 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Means not sharing the same letter in the column are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).  
 \*WSE: Whey Spread Emulsion  
 \*\*Whey Spread Emulsion incorporated with the concentrated aqueous extract from the 5% powdered plant material of *P. scoparius*

were, however, greater than those used in this study. Also, the use of polyphenolic extracts of plants and commercial teas in unstripped sunflower oils and mayonnaise samples could minimize lipid oxidation thanks to their antioxidants content and therefore enhance the oxidative stability of the lipid test systems studied [24]. The substitution of synthetic antioxidants with natural ones is suggested to be a good strategy to counteract the adverse effects of the latter, in terms of high concentrations use and low thermal stability observed during heat processing and frying of food products. Overall, natural antioxidants present the benefits to be recovered from low cost resources, with higher antioxidant activity and thermal stability than their synthetic counterparts [25]

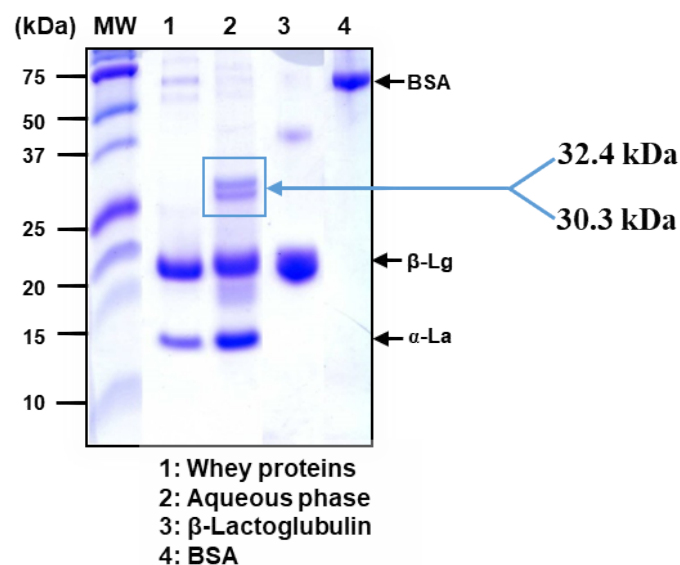
### Whey protein-polyphenols interaction by SDS-PAGE

Being motivated by the results obtained by our recent study on the interactions of antioxidants recovered from *Hibiscus sabdariffa* with whey proteins in a whey spread emulsion [16], we conducted this study to confirm those statements and to study the interactions of the antioxidants recovered from *P. scoparius* with proteins from the aqueous phase of a whey spread emulsion. Thus, the whey spread emulsion containing the lowest amount of the aqueous extract (100 ppm) has been selected to the study of protein-polyphenols interactions.

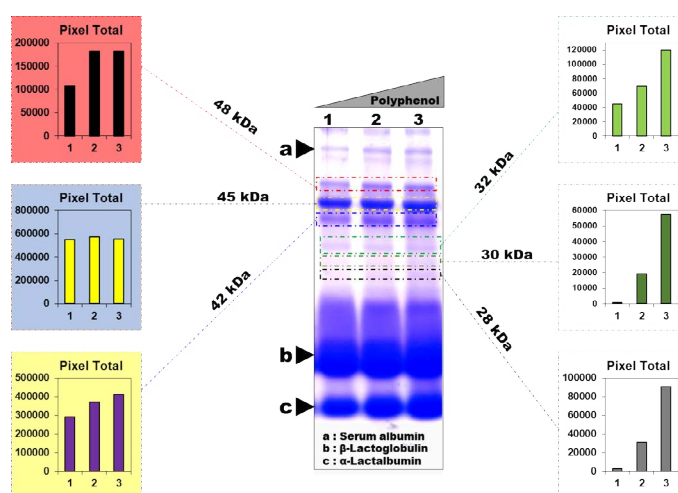
The Tricine SDS-PAGE patterns showed in Figure 1, depict blank whey proteins after pasteurization at 70 °C during 20 min (lane 1), the aqueous phase recovered from whey spread emulsion obtained by phase separation (lane 2), pure β-Lactoglobulin (β-Lg) (lane 3) and pure Bovin Serum Albumin (BSA) (lane 4). When visualizing the gel, the characteristic and different protein bands were easily recognizable. Lane 1 depicted very strong intensity of protein bands, with molecular weights respectively around 14 kDa and 18 kDa, and a very weak band intensity around 70 kDa. These bands corresponds respectively to α-Lactalbumine (α-La), β-Lg and BSA, as confirmed by pure standard of these proteins which were loaded in the lanes 3 and 4, respectively. Lane 2 clearly showed the formation of a dimer with a high molecular weight (30 ≤ MW ≤ 32 kDa). This high molecular complex formed did not undergo any split even with the presence of SDS and β-mercaptoethanol, likely to the strong association between the major whey proteins and some phenolic compounds present in the aqueous phase. Previous studies reported that the bonds involved are likely to be of covalent nature, with enhancement of intermolecular cross-linking [26,27]. The main protein involved in this case is β-Lg. Indeed, a study by Rawel *et al.* suggested the occurrence of a likely covalent cross linking, as a direct consequence of reactions at the free amino groups and tryptophan, so that *o*- or *p*-diphenols are oxidized to quinones, which react with lysine and tryptophan side chains in proteins [26]. However, this study showed a very good and interesting oxidative stability of the whey spread emulsion incorporated with aqueous extract of *P. scoparius* via the Rancimat method. Although

the formation of a whey protein-polyphenols complex, antioxidants still protect the emulsion from oxidation. Accordingly, Almajano *et al.* reported that an adduct is formed by the whey protein-phenolic acids complex, but the antioxidant activity of the phenolic acids involved is still intact [28].

In order to confirm whether the dimer observed in the aqueous phase is a complex formed due to polyphenol-whey protein interactions, a Tricine SDS-PAGE analysis was carried out on a mix of whey proteins/



**Figure 1.** SDS-PAGE analysis depicting the Coomassie blue gel of whey protein-polyphenols complexes of *P. scoparius* occurring in the aqueous phase of the whey spread emulsion. Lanes: (MW) standard protein marker (given in kDa at left-hand side); (1): crude whey; (2): Aqueous phase recovered from the whey spread emulsion; (3): pure β-lactoglobulin standard (4μg); (4): pure Bovine Serum Albumin (BSA) standard. The molecular weight of the framed protein dimers (whey protein-polyphenols complex) were determined by densitometry



**Figure 2.** SDS-PAGE and densitometry analyses of whey protein-polyphenols complexes of *P. scoparius*. The experiment was performed using a mix of antioxidants and whey by a direct contact of the concentrated aqueous extract with liquid whey used in the whey spread emulsion, at different ratios (gradient) of liquid whey/aqueous extract (1:75; 1:150 and 1:175). The arrows highlight **a**) Bovine Serum Albumin (BSA); **b**) β-Lactoglobulin (β-Lg) and **c**) α-Lactalbumin (α-La). Each protein band at each concentration of the antioxidant is given at left (protein bands with MW > 40 kDa) and right (protein bands with MW ≤ 32 kDa) of the Coomassie blue gel with the corresponding total pixel intensities obtained by the means of densitometry analysis conducted by Un-Scan-It gel 6.1 analysis program (Silk Scientific, Orem, UT)

antioxidants of different ratios; for instance 1:75, 1:150 and 1:175 (v/v), respectively. As depicted in Figure 2, densitometric analysis performed on the different protein bands of the gel highlighted the presence of band intensities corresponding to several complexes with different molecular weights. From the visualized Coomassie blue bands, 6 complexes were observed and at different molecular weights : 28, 30, 32, 42, 45, and 48 kDa. The results showed that the formation of the band depends on the molecular weight of the complex formed, and likely to that of the involved protein. On the basis of the histograms presented, the tendency of band intensities is mass-dependant for the complexes formed. Indeed, the increase of band intensities was strongly related with increasing amounts of whey proteins for low molecular weights (28, 30, and 32 kDa). As previously reported, the dimer formed showed two intense bands of 30.3 and 32.4 kDa, respectively. As the amount of the whey proteins fraction is relatively high (10 µg or 20 µL) in the mixes of different ratios, a broadening effect was noticed for the proteins β-Lg and α-La (major proteins in whey). Likely, there is no specific binding of these polyphenols on the surface of whey proteins. Their adsorption was not specifically occurring and the whole polyphenol is stacked onto each whey protein, irrespective of their chemical nature [29]. Therefore, it can be assumed that many polyphenols can bind at multiple sites on peptides as already reported [30]. On the contrary, for the complexes 42, 45, and 48 kDa, thus all protein with molecular weight > 40 kDa, the tendency is totally different and no general rule can be drawn from the evolution of band intensities and the molecular weights. However, further studies using accurate tools, such mass spectrometry to identify the origin and the relationships are required. The highly specific interactions suggest that the differences in affinity are functionally significant if we refer to some previous studies [31]. Moreover, it is worthwhile to cite that the strength of interactions depends on size of polyphenols, polyphenol structure and amino-acid protein sequence [32]. The polyphenolic compound may be also preserved in the complex formed and a positive effect would be in this situation related to the complexation phenomena since the overall antioxidant activity of the polyphenols is preserved [33].

## Conclusion

From the findings of the present study, we can conclude that *P. scoparius* is a potential source of bioactive compounds that exert a protective effect against oxidation. This is particularly important for food preservation, aiming to substitute sythetic antioxidants by natural ones, easily recoverable from available plant materials using relatively low cost processes. The evaluation of the polyphenolic content via spectrophotometry and their separation, quantification and identification via HPLC-DAD-ESI-MS revealed the occurrence of these antioxidants, among which chlorogenic acid, recognized to be even more effective than other flavonoids detected (quercetin) in delaying the oxidation process in whey spread emulsions. The results of Rancimat supported the beneficial effect of the aqueous extract as a natural additive. The aqueous phase showed the occurrence of a protein dimer, revealed by Tricine SDS-PAGE, resulting from the interactions between polyphenols of the aqueous extract and the whey proteins in the aqueous phase recovered from the whey spread emulsion. The dimer is a complex of molecular weight ranging from 30.3 to 32.4. Further works are still to be done under a double scope: *i*) identification of molecules involved in the complexation reaction between polyphenols and whey proteins, and to understand the underlying mechanisms by which they interact and more likely to propose a general scheme of interactions in real food formulations. *ii*) a scale up and a valorization of the industrial

application of these natural extracts in the fat and oils industry. Finally, we intend to propose in the forthcoming future versatile mixtures of several antioxidant components easy and ready-to-use as natural additives for manufacturers and customers of miscellaneous agro-food industries.

## Acknowledgements

The authors deeply thank the staff of CEVITAL spa. company at Bejaia city for their support and assistance. We further convey special thanks to Mr. Boualem HADJADJ and Mrs Amel SEFARI for their constant support and valuable help. The authors thank also INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1 for the financial support given to the research activities of A.C. Authors are also grateful for the financial support from the Slovenian Research Agency (P1-0005) and their valuable contribution. Authors would like to dedicate this work to Pr. Dr. LOUAILECHE H., full professor in the department of Food Sciences, FSNV, Université Abderrahmane Mira de Béjaia, in loving memory of the one who gave her soul to science with so much devotion and passion. You will never be forgotten.

## Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict to disclose.

## References

1. Di Mattia CD, Sacchetti G, Pittia P (2011) Interfacial Behavior and Antioxidant Efficiency of Olive Phenolic Compounds in O/W Olive oil Emulsions as Affected by Surface Active Agent Type. *Food Biophysics* 6: 295-302.
2. Phillips L, Whitehead D, Kinsella J (1994) Structure–function properties of food proteins. *Academic Press* San Diego.
3. Frankel EN, Huang SW, Kanner J, German JB (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J Agric Food Chem* 42: 1054-1059.
4. Bondet V, Cuvelier ME, Berset C (2000) Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: Focus on linoleic acid peroxidation induced by iron/ascorbic acid system. *J Amer Oil Chem Soc* 77: 813.
5. Cuvelier ME, Bondet V, Berset C (2000) Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: structure-Activity relationship. *J Amer Oil Chem Soc* 77: 819-824.
6. Walzem R, Dillard C, German JB (2002) Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42: 353-375. [[Crossref](#)]
7. Luhovyy BL, Akhavan T, Anderson GH (2007) Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. *J Am Coll Nutr* 26: 704S-12S. [[Crossref](#)]
8. Farrell H, Jimenez-Flores R, Bleck G, Brown E, Butler J, et al. (2004) Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *J Dairy Sci* 87: 1641-1674.
9. de Wit JN (1998) Marschall Rhône-Poulenc Award Lecture. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J Dairy Sci* 81: 597-608. [[Crossref](#)]
10. De Wit J (1990) Thermal stability and functionality of whey proteins. *J Dairy Sci* 73: 3602-3612.
11. Belgacem D, Ali K, Rachid R, Djazia A (2016) Effect of *Pituranthos scoparius* essential oils on reducing methanogenesis in cheep: In Vitro study. *Environmental Science: An Indian Journal* 12: 118-126.
12. Hamada H, Mohammed B, Massiot G, Long C, Lavaud C (2004) Alkylated isocoumarins from *Pituranthos scoparius*. *Nat Prod Res* 18: 409-413.
13. Gülçin İ, Oktay M, Kireççi E, Küfrevioğlu Öİ (2003) Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem* 83: 371-382.
14. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, et al. (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 97: 654-660.
15. Križman M, Baričević D, Prošek M (2007) Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC-MS using a monolithic reversed-phase column. *J Pharm Biomed Anal* 43: 481-485. [[Crossref](#)]

16. Chikhoun A, Gagaoua M, Nanema KD, Souleymane AS, Hafid K, et al. (2017) Antioxidant Activity of Hibiscus sabdariffa Extracts Incorporated in an Emulsion System Containing Whey Proteins: Oxidative Stability and Polyphenol–Whey Proteins Interactions. *Arabian Journal for Science and Engineering* 42: 2247-2260.
17. Gagaoua M, Boucherba N, Bouanane-Darenfed A, Ziane F, Nait-Rabah S, et al. (2014) Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex. *Sep Purif Technol* 132: 461-467.
18. Chikhoun A, Damjan Pavleca J, Shashkov M, Berroua Z, Chebbi K, et al. (2017) Antioxidant effect induced by the essential oil of *Pituranthos scoparius* in a formulation of a whey spread emulsion. *J Food Process Preserv* 41: e13163.
19. Dahia M, Siracusa L, Laouer H, Ruberto G (2009) Constituents of the polar extracts from Algerian *Pituranthos scoparius*. *Nat Prod Commun* 4: 1691-1692. [[Crossref](#)]
20. Dixon RA (2005) Engineering of plant natural product pathways. *Curr Opin Plant Biol* 8: 329-336.
21. Niggeweg R, Michael AJ, Martin C (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat Biotechnol* 22: 746-754. [[Crossref](#)]
22. Gallego MG, Gordon MH, Segovia FJ, Skowrya M, Almajano MP (2013) Antioxidant properties of three aromatic herbs (rosemary, thyme and lavender) in oil-in-water emulsions. *J Amer Oil Chem Soc* 90: 1559-1568.
23. Upadhyay R, Mishra HN (2014) Multivariate Analysis for Kinetic Modeling of Oxidative Stability and Shelf Life Estimation of Sunflower Oil Blended with Sage (*Salvia officinalis*) Extract Under Rancimat Conditions. *Food and Bioprocess Technology* 8: 801-810.
24. Ramsaha S, Aumjaud BE, Neergheen-Bhujun VS, Bahorun T (2015) Polyphenolic rich traditional plants and teas improve lipid stability in food test systems. *J Food Sci Technol* 52: 773-782. [[Crossref](#)]
25. Taghvaei M, Jafari SM (2015) Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *J Food Sci Technol* 52: 1272-1282. [[Crossref](#)]
26. Rawel HM, Kroll J, Hohl UC (2001) Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. *Nahrung* 45: 72-81. [[Crossref](#)]
27. Rawel HM, Czajka D, Rohn S, Kroll J (2002) Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *Int J Biol Macromol* 30: 137-150. [[Crossref](#)]
28. Almajano MP, Delgado ME, Gordon MH (2007) Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. *Food Chem* 101: 126-130.
29. von Staszewski M, Jara FL, Ruiz AL, Jagus RJ, Carvalho JE, et al. (2012) Nanocomplex formation between  $\beta$ -lactoglobulin or caseinomacropeptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. *J Funct Foods* 4: 800-809.
30. Charlton AJ, Baxter NJ, Khan ML, Moir AJ, Haslam E, et al. (2002) Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J Agric Food Chem* 50: 1593-1601. [[Crossref](#)]
31. Asquith TN, Butler LG (1986) Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochem* 25: 1591-1593.
32. Frazier RA, Deaville ER, Green RJ, Stringano E, Willoughby I, et al. (2010) Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *J Pharm Biomed Anal* 51: 490-495.
33. Stojadinovic M, Radosavljevic J, Ognjenovic J, Vesic J, Prodic I, et al. (2013) Binding affinity between dietary polyphenols and  $\beta$ -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed. *Food Chem* 136: 1263-1271. [[Crossref](#)]

# Cristallisation des lipides

Effet des huiles essentielles de *P. scoparius* dans la cristallisation isotherme de PO et Mix



## Introduction

L'huile de palme est considérée comme étant la seconde huile plus comestible au monde et la denrée possédant le rendement d'extraction le plus élevé (McCarthy et Cramb, 2009). Grâce à des profils en acides gras et triglycérides uniques, cette huile végétale possède un éventail d'applications alimentaires dont les fritures. C'est la seule huile végétale ayant une composition équilibrée en acides gras saturés et insaturés. L'huile de palme est aussi réputée pour être l'huile végétale de choix à mélanger avec d'autres huiles végétales insaturées comme les huiles de soja et de tournesol (Mba *et al.*, 2015). D'autres de ses propriétés documentées comme l'absence des acides gras *trans*, sa plasticité, sa stabilité thermique et ses prix compétitifs sont en faveur de sa place particulière comme source végétale primordiale des corps gras et des produits à base de ces derniers (Meng *et al.*, 2011). Au-delà de son utilisation dans les fritures, elle est communément utilisée comme une graisse semi-solide dans les shortenings où les structures cristallines formées suite au processus de cristallisation contrôlent les propriétés physiques du matériau alimentaire. Les études sur la cristallisation sont d'une valeur éminente d'un point de vue technologique mais aussi académique pour le contrôle de qualité du produit (Martini *et al.*, 2001). La composition chimique des corps gras et les conditions de transformation (process technologique) comme la température influencent le comportement de cristallisation des corps gras et constituent l'un des paramètres communs utilisés pour l'évaluation de la cristallisation des lipides (De Graef *et al.*, 2006).

Les huiles essentielles (EsO pour essential oils) sont des composés naturels, volatils et complexes dans leur composition, caractérisés par une forte note aromatique. Les molécules présentes dans les EsO sont synthétisées par les plantes aromatiques comme métabolites secondaires et sont généralement obtenues par entraînement à la vapeur ou hydrodistillation (Bakkali *et al.*, 2008). Certaines EsO possèdent une activité antioxydante leur permettant d'être utilisées dans les matrices alimentaires. Leur utilisation comme antioxydants naturels est un domaine attractif qui intéresse la communauté scientifique, particulièrement les chercheurs en sciences alimentaires désireux d'innover dans les formulations de produits alimentaires à base d'ingrédients naturels et qui aspirent pour le maintien de labels propres et respectueux de la santé et de l'environnement (Amorati *et al.*, 2013). L'activité antioxydante des EsO est surtout attribuée aux monoterpènes oxygénés présents comme composés majoritaires (Pérez-Rosés *et al.*, 2016). L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Pituranthos scoparius* a été démontrée dans une investigation très récente impliquant un mélange des huiles végétales de palme, soja et tournesol dans une émulsion type spread (Chikhouné *et al.*, 2017). La

composition de l'huile essentielle étudiée a démontré la prédominance des monoterpènes comme constituants majeurs. Cependant, l'effet de ces EsO sur les propriétés physiques des spreads est méconnu à ce jour. Etant donné que les caractéristiques physiques des lipides sont gouvernées par leur comportement de cristallisation, la compréhension des événements prenant place au sein des corps gras cristallisés est d'une importance significative dans le processus industriel des aliments principalement les corps gras (da Silva *et al.*, 2016). Afin d'incorporer les EsO comme antioxydants naturels dans les spread ou autres corps gras requérant une texture semi-solide, il est vital de comprendre le rôle que ces EsO jouent sur le comportement de cristallisation du système de corps gras à étudier. Une fois les EsO incorporées dans ces systèmes, une question est soulevée : ces substances peuvent-elles interférer dans le processus de cristallisation des corps gras, provoquant un changement conséquent dans leurs microstructures ?

La littérature scientifique semble d'un maigre apport pour répondre à cette question, car les études très peu nombreuses traitant l'influence des EsO sur la cristallisation des lipides sont limitées à l'étude de l'effet du limonène (Do *et al.*, 2008 ; Miyasaki *et al.*, 2015 ; Rigolle *et al.*, 2016) sur la microstructure et le polymorphisme du beurre de cacao pur. L'effet singulier d'un monoterpène ou d'un mélange de plusieurs monoterpènes sur le comportement de cristallisation de l'huile de palme (ou de son mélange avec d'autres huiles végétales) n'a jamais été rapporté.

L'objectif principal de la présente investigation est d'évaluer l'effet des EsO issues des parties aériennes de *P. scoparius* (fleurs et tiges) sur la cristallisation isotherme de l'huile de palme seule (PO pour palm oil) et en mélange avec les huiles de soja et de tournesol (Mix pour mixture). Les expérimentations de cristallisation isotherme sont réalisées à différentes températures (20, 21, 22, 23 et 24 °C) et (10, 13, 15, 17 et 20 °C) respectivement pour PO et Mix. Le comportement de cristallisation isotherme a été quantifié à travers les cinétiques de cristallisation, en utilisant la résonance magnétique nucléaire pulsée à basse résolution (p-NMR) et les profils de fusion par utilisation de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). L'influence des EsO sur la microstructure des lipides des huiles étudiées a été également évaluée par microscopie à lumière polarisée (PLM), pour rendre compte de probables changements de la morphologie et de la taille des cristaux formés dans les deux cas (cristallisation isotherme de PO et Mix). Un schéma général de l'étude est fourni en Figure 32.

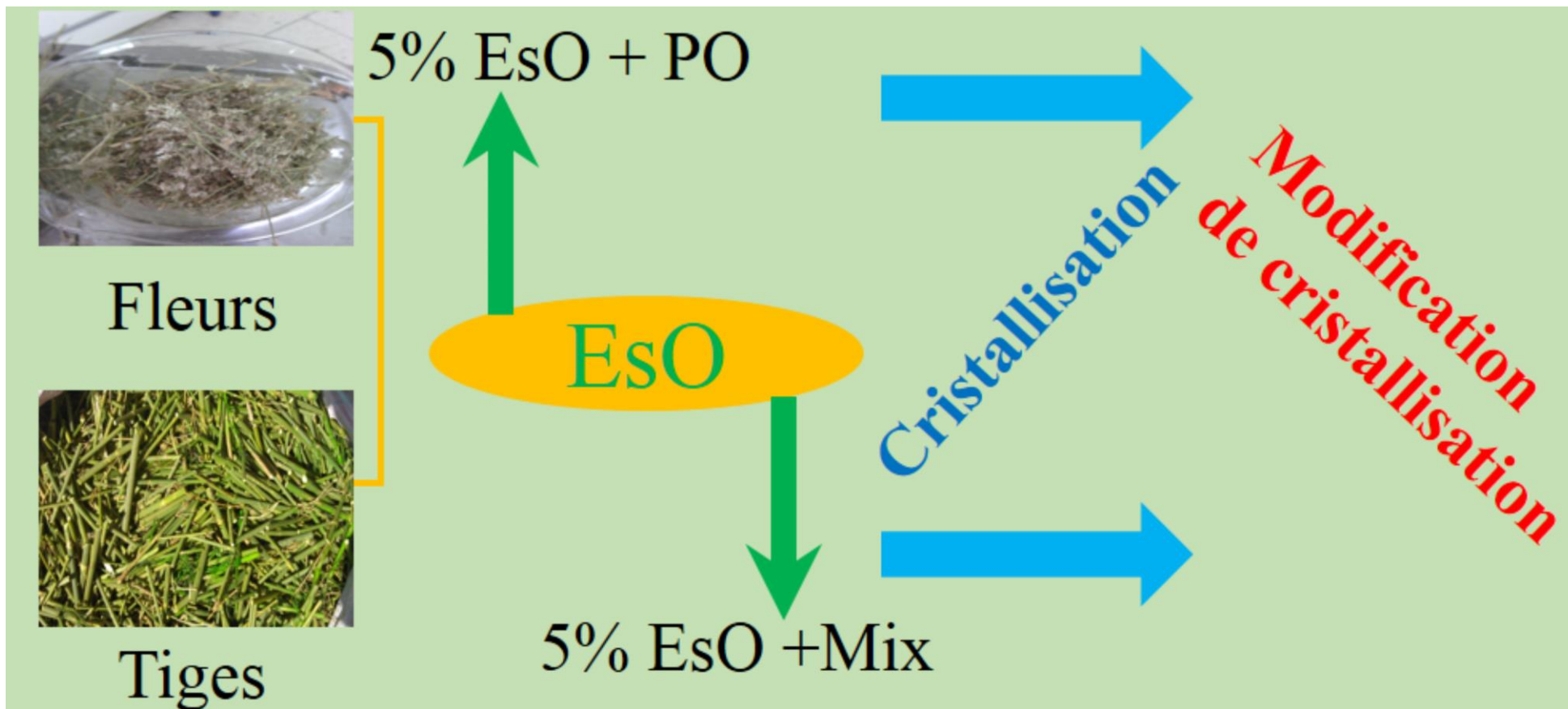


Figure 32 : schéma général de l'étude de l'effet des huiles essentielles de *P. scoparius* sur la cristallisation isotherme des lipides.

---

## Publication n° 04

### Addition of Essential Oils to Palm oil-based Fats: Effect on Isothermal Crystallization

Chikhoun A., Shashkov M., Piligaev A.V., Lee J., Boudjellal A. et Martini S.  
*Soumis pour publication dans Food Chemistry (2018) xx (xx) : xxxx – xxxx.*

---

#### Résumé

L'objectif de cette investigation est l'étude de l'effet des huiles essentielles (5% m/m) extraites par hydrodistillation à partir des fleurs et des tiges de *Pituranthos scoparius*, sur la cristallisation isotherme de l'huile de palme et un mélange constitué des huiles végétales de palme, de soja et de tournesol à différentes températures. Les huiles essentielles, caractérisées par GC-FID-MS et GCxGC, sont constituées de monoterpènes dont l' $\alpha$ -pinène et le sabinène constituent les composés majoritaires. L'addition des huiles essentielles n'a pas occasionné de changements dans les points de fusion, mais a affecté le comportement à la cristallisation des graisses étudiées. Un retard dans la cristallisation a été observé, appuyé par des enthalpies de fusion plus basses, des vitesses de cristallisations plus lentes et des taux de solides plus bas. Différentes formes et tailles pour les cristaux sous forme de sphérulites pour les graisses contenant les huiles essentielles par rapport aux graisses témoins. Les résultats de la présente étude suggèrent que les huiles essentielles de *P. scoparius* peuvent être utilisées comme additifs naturels pour modifier la cristallisation des corps gras, pour des applications alimentaires. Ces effets sur le comportement à la cristallisation peuvent compléter les propriétés antioxydantes des huiles essentielles de *P. scoparius*.

---

**Mots clés** : huiles essentielles ; monoterpènes ; huiles végétales; huile de palme ; cristallisation ; sphérulites.

Manuscript Number:

Title: Addition of Essential Oils to Palm oil-based Fats: Effect on Isothermal Crystallization

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: essential oils; palm oil; Pituranthos scoparius; monoterpenes; crystallization; spherulites

Corresponding Author: Dr. Silvana Martini, PhD

Corresponding Author's Institution: Utah State University

First Author: Anis Chikhoun

Order of Authors: Anis Chikhoun; Mikhail Shashkov; Aleksandr Piligaev; Juhee Lee; Abdelghani Boudjellal; Silvana Martini, PhD

Abstract: The objective of this investigation is to study the effect of essential oils (5% w/w) obtained from the flowers and stems of Pituranthos scoparius on the isothermal crystallization of palm oil and a blend of palm oil, sunflower, and soybean oils at different temperatures. The essential oils are constituted by monoterpenes with  $\alpha$ -pinene and sabinene being the major constituents. The addition of the essential oils did not change the melting points, but affected the crystallization behavior of fats. A delay in crystallization was observed, evidenced by lower melting enthalpies, lower crystallization rates, and lower solid fat contents. Different shapes and sizes of spherulite-shaped crystals were observed for the fats containing the essential oils compared to those without essential oils. Results from this study show that the essential oils of P. scoparius can be used as natural additives to modify the crystallization of fats for food applications.



Department of Nutrition,  
Dietetics, and Food Sciences  
College of Agriculture and Applied Sciences

August 6<sup>th</sup>, 2018

Editor-in-Chief  
P. Finglas  
Quadram Institute Bioscience, Norwich, England, UK

**Subject: Manuscript submission to Food Chemistry**

---

Dear Dr. Finglas,

Please consider the manuscript “Addition of Essential Oils to Palm oil-based Fats: Effect on Isothermal Crystallization” by Chikhoun et al. for publication in the Food Chemistry journal.

This manuscript reports the effect of essential oils obtained from flowers and stems of *Pituranthos scoparius* on the crystallization behavior of palm oil and a mixture of palm oil and other vegetable oils. These essential oils have been previously used as natural antioxidants in margarines formulated with the oils mentioned above. However, the effect that these essential oils have on the crystallization behavior and therefore physical properties of the products have never been evaluated. With current tendencies of using more natural additives in food products there is a need to understand how these natural additives affect product quality beyond their oxidative stability.

Our research shows that the addition of these essential oils delays the crystallization of palm oil but it has a lower effect on a fat with lower level of saturation, such as a mixture of palm oil and other vegetable oils. The effect on crystallization behavior might be due to the amount of limonene in the essential oils but also to the presence of other terpenes such as sabinene and pinene.

Results from this research will provide valuable information to scientists and food producers that are looking to incorporate natural ingredients in their products.

We would appreciate if you consider this manuscript for publication in the Food Chemistry journal.

Sincerely,

Silvana Martini, PhD  
Professor  
Department of Nutrition, Dietetics, and Food Sciences  
Utah State University  
Phone: 435-797-8136; e-mail: [silvana.martini@usu.edu](mailto:silvana.martini@usu.edu)

Highlights:

- Essential oils (EsO) are extracted from flowers and stems of *Pituranthos scoparius*
- Their terpene content is characterized by chromatography (GC-MS and GCxGC)
- Their addition at 5% (w/w) and impact on crystallization of fats is studied
- Crystallization experiments on fats with EsO are performed by DSC, p-NMR and PLM
- These antioxidants act as modifiers of crystallization in fats at 5% (w/w)

1     **Addition of Essential Oils to Palm oil-based Fats: Effect on Isothermal Crystallization**

2             Anis Chikhoun<sup>a</sup>, Mikhail Shashkov<sup>b,c</sup>, Aleksandr Vasilyevich Piligaev<sup>b</sup>, Juhee Lee<sup>d</sup>,

3                             Abdelghani Boudjellal<sup>a</sup> and Silvana Martini<sup>\*,d</sup>

4             <sup>a</sup>Equipe Maquav, Laboratoire BIOQUAL, Institut de Nutrition, de l'Alimentation et des  
5 Technologies Agroalimentaires (INATAA), Université Frères Mentouri Constantine 1, 7<sup>e</sup> km  
6                             Route de Sétif, 25000-Constantine, Algeria

7             <sup>b</sup>Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, 630090, Pr. Lavrentyeva. 5, Novosibirsk, Russian  
8                             Federation

9             <sup>c</sup>Novosibirsk state University, 630090, Pyrogova St., 2, Novosibirsk, Russian Federation,  
10                             630090

11             <sup>d</sup>Utah State University, Department of Nutrition, Dietetics, and Food Sciences, 8700 Old  
12                             Main Hill, Logan, Utah, 84322-8700

13             \*Corresponding author: Email: [silvana.martini@usu.edu](mailto:silvana.martini@usu.edu); Phone: 435-797-8136.

14



15 ABSTRACT

16 The objective of this investigation is to study the effect of essential oils (5% w/w) obtained  
17 from the flowers and stems of *Pituranthos scoparius* on the isothermal crystallization of palm  
18 oil and a blend of palm oil, sunflower, and soybean oils at different temperatures. The  
19 essential oils are constituted by monoterpenes with  $\alpha$ -pinene and sabinene being the major  
20 constituents. The addition of the essential oils did not change the melting points, but affected  
21 the crystallization behavior of fats. A delay in crystallization was observed, evidenced by  
22 lower melting enthalpies, lower crystallization rates, and lower solid fat contents. Different  
23 shapes and sizes of spherulite-shaped crystals were observed for the fats containing the  
24 essential oils compared to those without essential oils. Results from this study show that the  
25 essential oils of *P. scoparius* can be used as natural additives to modify the crystallization of  
26 fats for food applications.

27

28 **KEYWORDS:** essential oils, palm oil, *Pituranthos scoparius*, monoterpenes, crystallization,  
29 spherulites.

30

## 31 **1. Introduction**

32 Palm oil is considered the second most consumed edible oil worldwide and the highest  
33 yielding vegetable oil crop ([McCarthy & Cramb, 2009](#)). Thanks to a unique profile of fatty  
34 acids and triacylglycerols this oil can be used for numerous food applications including  
35 frying. It is the only vegetable oil to have a balanced composition of saturated and unsaturated  
36 fatty acids. Palm oil is recognized as the oil of choice for blending with other edible  
37 unsaturated oils such as sunflower and soybean oil. This has benefits in frying oils by  
38 ensuring a fine tuning of the fatty acid composition and enhancing the shelf life of the product  
39 ([Mba, Dumont, & Ngadi, 2015](#)). Other documented properties of palm oil such as its *trans*-  
40 free characteristic, its plasticity, its heat stability and its price competitiveness are in favor to  
41 consider palm oil as a prominent fat and oil resource for vegetable oil-based fat products  
42 ([Meng, Liu, Jin, Huang, Song, Wang, et al., 2011](#)). Beyond using palm oil for frying, this oil  
43 is commonly used as a semi-solid fat in shortenings where the crystalline structure formed  
44 upon crystallization drives the physical properties of the material. Crystallization studies are  
45 of a prominent value from both technological and academic points of view to control product  
46 quality ([Martini, Herrera, & Hartel, 2001](#)). Fat chemical composition and processing  
47 conditions such as temperature influence the crystallization behavior of fats and are some of  
48 the common parameters used to evaluate fat crystallization ([De Graef, Dewettinck, Verbeken,  
49 & Foubert, 2006](#)).

50 Essential oils (EsO) are volatile, natural, complex compounds characterized by a strong  
51 aroma. Molecules present in EsO are synthesized by aromatic plants as secondary metabolites  
52 and are usually obtained by steam or hydro-distillation ([Bakkali, Averbeck, Averbeck, &  
53 Idaomar, 2008](#)). Some EsO depict antioxidant activity encouraging their use in food systems.  
54 Their use as natural antioxidants is an interesting field that attracts the food science  
55 community that is willing to formulate products using natural compounds and maintain a

56 clean label ([Amorati, Foti, & Valgimigli, 2013](#)). In particular, antioxidant activity is  
57 commonly observed in EsO containing oxygenated monoterpenes as major components  
58 ([Pérez-Rosés, Risco, Vila, Peñalver, & Cañigüeral, 2016](#)). The antioxidant activity of the EsO  
59 obtained from *Pituranthos scoparius* has been demonstrated in a recent investigation  
60 involving a blend of palm oil, sunflower oil, and soybean oil in a whey spread emulsion  
61 ([Chikhouné, Damjan Pavleca, Shashkov, Berroua, Chebbi, Bougherra, et al., 2017](#)). The  
62 composition of the EsO studied showed clearly the dominance of monoterpenes as major  
63 constituents. However, it is unknown if these EsO will affect the physical properties of these  
64 spreads. Since the physical characteristics of lipids are governed by their crystallization  
65 behavior, the understanding of the events taking part in crystallized fats are of significant  
66 importance in industrial processing of food products mainly fats ([da Silva, Soares, Maruyama,  
67 Dagostinho, Silva, Ract, et al., 2016](#)). To incorporate EsO as natural antioxidants in spreads or  
68 other products that require a semi-solid texture it is vital to understand the role that the EsO  
69 play on the crystallization behavior of the fat system.

70 To the best of our knowledge, limited reports deal with the effects of EsO on the  
71 crystallization behavior of fats. Only few studies with limonene ([Do, Vieira, Hargreaves,  
72 Wolf, & Mitchell, 2008](#); [Miyasaki, Santos, Vieira, Ming, Calligaris, Cardoso, et al., 2015](#);  
73 [Rigolle, Goderis, Van Den Abeele, & Foubert, 2016](#)) have shown its effect on the  
74 microstructure and polymorphism of cocoa butter. The effect of a single or a mixture of  
75 monoterpenes on the crystallization behavior of palm oil (alone or blended with other  
76 vegetable oils) was never reported. The hypothesis of this study is that EsO obtained from the  
77 aerial parts of *P. scoparius* affect the crystallization behavior of fats. Therefore, the purpose  
78 of this study is to characterize EsO obtained from the aerial parts (flowers and stems) of *P.*  
79 *scoparius* and to evaluate the effect that these EsO have on the isothermal crystallization of  
80 palm oil and palm oil mixed with sunflower and soybean oils. The crystallization behavior

81 under isothermal conditions was examined at different temperatures, by quantifying the  
82 crystallization kinetics using pulsed nuclear magnetic resonance and be evaluating the melting  
83 profiles using differential scanning calorimetry (DSC). The microstructure of the crystals  
84 obtained was evaluated using polarized light microscopy (PLM).

## 85 **2. Materials and Methods**

### 86 2.1. Materials

#### 87 2.1.1. Isolation of Essential Oils

88 Aerial parts, consisting of flowers and stems, of *Pituranthos scoparius* were collected from  
89 Msila, situated in the northeast of Algeria. The samples were collected at the end of October  
90 2015 (flowers) and at the beginning of April 2016 (stems). The plant material was left for  
91 natural drying for approximately 2 months in the laboratory at room temperature. An amount  
92 of 150 g of the plant material was subjected to hydrodistillation for 5 h on a Clevenger type  
93 apparatus. The EsO was then separated from the aqueous phase in a glass tube and gently  
94 collected with a Pasteur pipet. The EsO from flowers (EsOF) and stems (EsOS) recovered by  
95 hydrodistillation were dried over a filter paper containing sodium sulfate and stored in the  
96 dark at 4 °C in a glass vial until use.

#### 97 2.1.2. Materials and Sample Preparation

98 The liquid vegetable oils used in this study were purchased from a local market (Logan, UT,  
99 USA). Soybean oil (SBO) and sunflower oil (SFO) were from Kroger. Palm oil (PO) was  
100 donated by ADM. A mixture (Mix) of SBO, SFO, and PO was prepared in the proportions  
101 2:1:1, w/w/w, respectively to reproduce the proportions used to formulate a spread in our  
102 previous study ([Chikhoun, Damjan Pavleca, Shashkov, Berroua, Chebbi, Bougherra, et al.,  
103 2017](#)). Samples of PO and Mix containing 5% (w/w) essential oil of *P. scoparius* were  
104 prepared by adding 50 mg of the essential oils in one gram of previously heated fat. After the

105 addition of the EsO, the mixture was homogenized by stirring with a spatula. A total of 6  
106 samples were studied: (i) PO without essential oils (EsO) (PO), (ii) PO with the addition of  
107 5% of EsOF (PO+EsOF), (iii) PO with the addition of 5% of EsOS (PO+EsOS), (iv) Mix  
108 sample without EsO (Mix), (v) Mix sample with the addition of 5% EsOF (Mix+EsOF), and  
109 (vi) Mix sample with the addition of 5% EsOS (Mix+EsOS).

## 110 2. Methods

### 111 2.1. GC-MS Analysis of the Hydro-Distilled Essential Oils

112 GC-MS identification was performed using an Agilent 7000 GC/MS system equipped with a  
113 HP-5ms fused silica capillary column (30 m \* 0.25 mm \* 0.25  $\mu$ m). Temperature was  
114 programmed from 60 °C (5 min) to 150 °C at 5 °C/min and then at a rate of 15 °C/min until  
115 240 °C, with a 10 min hold. Helium was used as a carrier gas (1 mL/min), injection was in  
116 split mode (1:200) with injector temperature at 280 °C. The mass spectrometer worked in EI  
117 mode at 70 eV, scan range 40-400 m/z. The identification of components was based on  
118 computer matching of their mass spectra with those of NIST'11 mass spectral library (NIST  
119 MS Search 2.0, 2005) as well as on comparison of their retention indices with indices from  
120 NIST database.

### 121 2.2. Fatty Acid Methyl Esters (FAME) Analysis

#### 122 2.2.1. Sample Preparation

123 5-10 mg of neat fat sample were dissolved in 1 mL of 5% sulfuric acid solution (in dry  
124 Methanol), and 200  $\mu$ L of toluene and internal standard (2mg of methylundecanoate) were  
125 added after heating the solution at 90 °C for 1 hour. After that, 100  $\mu$ L of water were added  
126 and the methyl esters formed were extracted using 400  $\mu$ L of hexane.

#### 127 2.2.2. Quantification and Identification

128 GC analysis and MS identification of FAMES were performed by using an Agilent 7000  
129 GC/MS system equipped with ionic liquid custom column (N-Propyl4MPyNtf2 25 m \* 0.25  
130 mm \* 0.2  $\mu$ m). Temperature was programmed from 90 °C (3 min) to 230 °C at 8 °C/min.  
131 Helium was used as a carrier gas (1 mL/min); injection was in split mode (1:30) with injector  
132 temperature at 250 °C. The mass spectrometer was in the EI mode at 70 eV, scan range 40-  
133 400 m/z. The identification of components was based on computer matching of their mass  
134 spectra with those of NIST'11 mass spectral library (NIST MS Search 2.0, 2005).

### 135 2.3. Triacylglycerol (TAG) Analysis by LC-MS

136 Analyses were performed using a Shimadzu HPLC-MS 2020 system, equipped with a column  
137 PerfectSil Target ODS-3 C18 (250  $\times$  4.6 mm). Data was collected and processed using Lab  
138 Solution v. 5.53. Methanol: isopropanol (70:30, v/v) was used as a mobile phase. Injection  
139 volume was 5  $\mu$ L, flow rate of the mobile phase was 1 mL.min<sup>-1</sup>, column temperature was 50  
140 °C, ionization mode was DUIS (ESI/APCI) and m/z scanned mass range was 100-1000.

### 141 2.4. Melting Point

142 The melting points of the samples studied were determined using the method of capillary tube  
143 according to the AOCS official method Cc 1-25. Capillary tubes containing the fat samples  
144 were placed at -20 °C overnight. The tubes were attached to a thermometer, submerged in a  
145 beaker full of cold water and heated with a continuous stirring at 0.5 °C/min. The melting  
146 point was recorded as the temperature at which the fat inside the capillary tube began to rise  
147 due to hydrostatic pressure. The melting point reported was an average of three replicates.

### 148 2.5. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

149 Isothermal DSC experiments were performed using a DSC Q20 with RCS cooling system  
150 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). The DSC baseline and temperature were calibrated  
151 with a pure indium standard. A sealed and empty aluminum pan was used as reference.

152 Samples (10-15 mg) were covered and sealed with aluminum lids in Tzero hermetic  
153 aluminum pans (TA Instruments). The isothermal crystallization procedure consisted in  
154 heating the samples to 60 °C and holding them for 15 min to ensure complete melting and to  
155 erase any crystal memory. The system was then cooled from 60 °C to the crystallization  
156 temperatures ( $T_c$ ) of 20, 21, 22, 23, and 24 °C for PO, PO+EsOF, PO+EsOS, and 10, 13, 15,  
157 and 17 °C for the Mix, Mix+EsOF, and Mix+EsOS samples at a ramp rate of 5 °C/min.  
158 Samples were kept at  $T_c$  for 60 min and then heated to 60 °C at a ramp rate of 5 °C/min to  
159 obtain a melting endotherm of the previously crystallized sample. The melting peak  
160 temperature ( $T_p$ ) and the change in enthalpy associated with the melting processes ( $\Delta H_m$ )  
161 were calculated using the TA Universal Analysis Software.

## 162 2.8. Determination of Solid Fat Content (SFC)

163 SFC of the samples was evaluated by low resolution pulsed magnetic resonance (p-NMR)  
164 using a Minispec mq 20 NMR Analyzer (Bruker, Germany). Samples were completely melted  
165 in an oven at 60 °C and homogenized by stirring with a glass rod. After that, samples were  
166 placed in four NMR tubes, placed in a water bath ( $t = 0$ ), and kept at specific crystallization  
167 temperatures ( $T_c$ ) for 60 min.  $T_c$  tested for PO, PO+EsOF, and PO+EsOS samples were 20,  
168 21, 22, 23 and 24 °C.  $T_c$  tested for Mix, Mix+EsOF, and Mix+EsOS samples were 10, 13, 15,  
169 17 and 20 °C. SFC was measured starting at  $t = 0$  (moment at which the tubes were placed in  
170 the water bath) as a function of time using the four NMR tubes which were measured in  
171 sequence and immediately placed back in the water bath after the measurement. SFC values  
172 were measured every 2 min for 60 min. The measurements for every sample studied were  
173 performed in triplicate and mean values were fitted to the Avrami equation:

$$SFC = SFC_m (1 - e^{-k_n \times t^n})$$

174 Where  $t$  is time,  $k_n$  is the rate constant,  $SFC_m$  is the maximum SFC obtained when the sample  
175 reaches equilibrium, and  $n$  represents the index of the reaction ([Chiavaro, 2014](#); [Toro-  
176 Vazquez, Dibildox-Alvarado, Charó-Alonso, Herrera-Coronado, & Gómez-Aldapa, 2002](#)).

## 177 2.9. Microscopy and Crystal Morphology

178 The microstructure of crystals obtained for all samples was observed using a polarized light  
179 microscope (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) equipped with a digital  
180 camera and data capture software (Lumenera's Infinity 2, Lumenera Corp., Nepean, Canada).  
181 A small drop of molten sample was deposited onto glass microscope slide and carefully  
182 covered with a glass cover slip. An isothermal procedure, similar to that used in the DSC was  
183 used for all samples. Pictures of crystals were taken as a function of time using 10X  
184 magnification. Pictures obtained at 60 min were used for data analysis. Crystal size was  
185 quantified using Image-Pro Premier software (version 9.2.22, Media Cybernetics, Rockville,  
186 MD, USA). Triplicate of images were analyzed for all the samples and crystal sizes (radius,  
187  $\mu\text{m}$ ) were reported as mean  $\pm$  standard deviation.

## 188 2.10. Statistical Analysis

189 The EsO composition data (EsOF and EsOS) are presented as means  $\pm$  SD and data were  
190 analyzed in duplicate using a paired t-test ( $\alpha < 0.05$ ). The TAG and DSC melting parameters  
191 were taken in duplicate and are reported as means  $\pm$  SD. FAME, melting points and SFC  
192 measurements were performed in triplicate and values reported are means  $\pm$  SD. Differences  
193 between groups were tested by an analysis of variance (ANOVA), followed by a least  
194 significance difference (LSD) *post hoc* test ( $\alpha < 0.05$ ). One-way ANOVA was performed for  
195 FAME and TAG whereas two-way ANOVA was performed for DSC melting experiments  
196 using STATISTICA software package (7.0) (StatSoft, USA).

## 197 3. Results and Discussion



### 198 3.1. GC-MS Analysis of the Essential Oils Obtained by Hydro-Distillation

199 The composition of the EsO obtained by hydro-distillation from the flowers (EsOF) and stems  
200 (EsOS) of *P. scoparius* is presented in Table 1. A total of 44 components were detected in  
201 EsOF and 37 components were detected in EsOS. These compounds fall mainly into five  
202 distinct groups: monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, aromatic  
203 monoterpenes, sesquiterpene hydrocarbons, and oxygenated sesquiterpenes (supplementary  
204 material, Fig. S1). Some of these compounds are common for both EsO, others are specific  
205 for each one. The major group among the listed compounds is represented by the  
206 monoterpene hydrocarbons group with the major compounds being  $\alpha$ -pinene, sabinene,  $\beta$ -  
207 pinene, 3-carene, p-cymene, limonene and  $\alpha$ -phellandrene. Oxygenated monoterpenes were  
208 also present and were represented in both EsO by terpinen-4-ol, *cis*- $\beta$ -terpineol, (-)-  
209 spathulenol, *cis*-verbenol and *cis*-sabinol. Germacrene and  $\beta$ -eudesmol are sesquiterpenes and  
210 were both detected in the EsO. Some compounds such as  $\alpha$ -pinene, sabinene,  $\beta$ -pinene, and 3-  
211 carene depicted higher contents in EsOS ( $p < 0.05$ ); whereas limonene, germacrene, *cis*- $\beta$ -  
212 terpineol,  $\alpha$ -phellandrene and  $\beta$ -eudesmol were in higher contents in the EsOF ( $p < 0.05$ ). The  
213 chemotype of both essential oils is identified as that of  $\alpha$ -pinene-sabinene, as these are the  
214 major compounds in both EsO and are in agreement with previous reports ([Lograda,](#)  
215 [Ramdani, Kiram, Chalard, & Figueredo, 2013](#)).

### 216 3.2. Fatty Acid Methyl Ester Composition (FAME)

217 The FAME of the oils used in this study (SFO, SBO, and PO) was in agreement to previous  
218 reports (supplementary material, Table S1) ([Gunstone, Harwood, & Dijkstra, 2007](#); [O'Brien,](#)  
219 [2008](#)). Saturated fatty acids were represented by myristic (C14:0), palmitic (C16:0), margaric  
220 (C17:0), stearic (C18:0), arachidic (C20:0), and behenic (C22:0). Unsaturated fatty acids were  
221 mainly oleic (C18:1), linoleic (C18:2) and linolenic (C18:3). Palmitic acid was the  
222 predominant FA in PO (50.30 %) followed by oleic acid (38.1 %), and linoleic acid (7.1%).

223 The content of unsaturated fatty acids in SBO were largely predominant; linoleic acid (60.6  
224 %) and oleic acid (18.3 %), compared to that of saturated fatty acids such as palmitic acid  
225 (10.8 %). SFO showed a marked predominance of unsaturated fatty acids corresponding to  
226 linoleic acid (64.7 %), linolenic acid (18.2 %), when compared to saturated FA, with a content  
227 for stearic acid of 9.1 %.

### 228 3.3. Triacylglycerol Composition (TAG)

229 The TAG composition of the oils tested are also in agreement with previous reports  
230 (supplementary material, Table S2) ([O'Brien, 2008](#)). SFO showed a noticeable amount of  
231 triunsaturated TAGs (58.03 %) constituted mainly by LLL, OOL, and LOL; while the  
232 monosaturated TAGs represented the second group of molecules (37.20 %) which included  
233 SOO, LOP and OOP. Disaturated represented the lowest content among the groups (4.79 %),  
234 whereas no content for trisaturated TAGs were reported.

235 SBO depicted a similar composition to SFO with a high content of triunsaturated TAGs  
236 (48.03 %) including LLL, LLLi, LOL, OOL, and OOO. Monosaturated TAGs was the second  
237 most important group (37.10 %) and was represented by LOP, LLP, and LLS. Disaturated  
238 (10.03 %) is the less abundant group. Trisaturated TAGs were not detected and a low content  
239 of unknown TAGs was detected (4.83 %).

240 In PO monosaturated TAG constituted the most abundant group (43.23 %) and the  
241 representative components of this group were OOP, LOP, SOO, and LLP. The disaturated  
242 TAGs were the second most important group (27.79 %) which include mainly: PLP, POP and  
243 POS followed by triunsaturated (11.88 %) and trisaturated (10.16 %) TAGs.

### 244 3.4. Melting Point

245 Melting points (MP) of palm oil (PO) and Mix with and without the addition of EsO from  
246 flowers and stems were evaluated. The addition of EsO did not affect the MP of PO ( $34.2 \pm$

247 0.4 °C) nor of the Mix ( $22.6 \pm 0.3$  °C) ( $p > 0.05$ ). As expected, the MP of Mix is lower than  
248 that of PO due to its high content of unsaturated fatty acids and TAG composition (Tables S1  
249 and S2 in supplementary material).

### 250 3.5. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

251 Fig. 1 A and B show the melting parameters of the PO crystallized with and without the  
252 addition of EsO.  $T_p$  significantly increased as with  $T_c$  (Fig. 1A,  $p < 0.05$ ); however, no  
253 differences in  $T_p$  were observed between the PO samples crystallized with and without the  
254 addition of EsO. Melting enthalpies were also affected by  $T_c$  ( $p < 0.05$ ) with lower melting  
255 enthalpies obtained at higher  $T_c$  (Fig. 1B). Higher melting enthalpies were obtained for the PO  
256 crystallized without the addition of EsO ( $p < 0.05$ ). Lower melting enthalpies suggest a lower  
257 degree of crystallinity in the sample suggesting that the addition of the EsO delays the  
258 crystallization of PO, especially at low  $T_c$ . From previously published work on the effect of  
259 limonene in the crystallization of pure cocoa butter ([Rigolle et al., 2016](#)) a significant  
260 decrease of total melting enthalpy resulted when limonene was added in the range of 0 to 5%.  
261 This was explained by an inhibition in the crystallization of pure cocoa butter by limonene.  
262 Since EsOF and EsOS of *P. scoparius* contain limonene and other terpene molecules (Table  
263 1) it is believed that the same phenomena occur in PO when the EsO are added at 5%.  
264 According to the data shown in Fig. 1B the addition of EsOF had a greater effect on the  
265 melting behavior of the PO compared to EsOS.

266 Fig. 1C and D show the data corresponding to the melting behavior of the Mix samples  
267 crystallized with and without the addition of EsO.  $T_p$  values of Mix samples were not affected  
268 by  $T_c$  nor by the addition of EsOF; however a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in  $T_p$  was  
269 observed for Mix samples crystallized with EsOS, especially when the samples were  
270 crystallized at lower temperatures (10 and 13 °C). Melting enthalpies decreased as  $T_c$

271 increased for all samples ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1D). The melting enthalpies observed at 10 and 13  
272 °C of Mix+EsOS (4.8 and 5.2 J/g) were higher than those of Mix+EsOF (3.0 and 2.1 J/g) and  
273 Mix without addition of the EsO (3.0 and 3.2 J/g) ( $p < 0.05$ ) suggesting that EsOS promoted  
274 crystallization in the Mix sample. At 15 and 17 °C no significant difference ( $p > 0.05$ ) was  
275 observed between the enthalpy values of Mix (3.0 and 2.1 J/g) and Mix+EsOS (3.5 and 2.8  
276 J/g), whereas a significantly lower enthalpy was observed for the Mix+EsOF (1.6 and 0.7 J/g)  
277 samples ( $p < 0.05$ ) suggesting that the EsOF inhibited the crystallization of Mix samples (Fig.  
278 1D). Lastly, the addition of EsO did not affect the melting enthalpy of Mix samples  
279 crystallized at 20 °C.

280 Studies on the effect of addition of EsO in fats are limited to the effect of addition of  
281 limonene in pure cocoa butter or chocolate. [Do et al. \(2008\)](#) studied the softening effect of  
282 limonene, a monoterpene hydrocarbon, in a reduced fat chocolate. These authors  
283 hypothesized that the action of limonene can be summarized by two main points. First,  
284 limonene, which does not crystallize when added to the fat likely imparts a dilution effect in  
285 the system. Second, the addition of limonene can affect the crystallization pattern of the fat in  
286 which it is incorporated, preventing the crystallization of the fat crystal. In another work [Ray](#)  
287 [et al. \(2012\)](#) stated that the effect of limonene could be due to a plasticization of the TAG  
288 chains lowering the induction times for the isothermal crystallization and accelerating the  
289 phase transition from less stable polymorphic forms to the most stable ones. This effect was  
290 also supported by [Miyasaki et al. \(2015\)](#) and [Rigolle et al. \(2016\)](#) who observed similar  
291 effects in cocoa butter and cocoa butter substitutes suggesting that limonene had a physical  
292 barrier-like behavior preventing the crystallization of cocoa butter and decreasing fat  
293 crystallinity.

294 In our study, the effect of the EsO from flowers and stems cannot be attributed to a dilution  
295 effect since the melting points of PO and Mix were not affected by the addition of the EsO as

296 previously described. Therefore, our results can be explained by the second hypothesis of [Do](#)  
297 [et al. \(2008\)](#) in which it is stated that limonene affects fat crystallization by interfering with  
298 the formation of the crystalline network. From Table 1 there are several monoterpenes  
299 occurring in the EsO used in our study in which limonene is identified in flowers (4.05 %) and  
300 stems (1.47 %). This would explain the inhibition effect of EsOF on the crystallization of  
301 PO and the Mix samples. However, other major monoterpenes are also present in these EsO  
302 and therefore, the effects observed cannot be attributed to a single component as in the case of  
303 limonene. The major monoterpenes present in the EsO studied are  $\alpha$ -pinene and sabinene.  
304 These small molecules, with relatively low molecular weight compared to TAG may interfere  
305 during the crystallization process. They are likely to compete for the space in the crystal  
306 lattice with the TAG molecules resulting in a steric hindrance ([Do et al., 2008](#)). The EsO used  
307 in in our study were added at very small amounts (5 % w/w) and can therefore be considered  
308 additives or minor components ([Smith et al., 2011](#)). [Smith et al. \(2011\)](#) explain how minor  
309 components in fats can affect both nucleation and crystal growth. The effects could appear in  
310 alteration of nucleation time, shift of nucleation temperature, and change in the number and  
311 nature of the nuclei formed. In a study of the effect of some additives on the isothermal  
312 crystallization of coconut oil, it was demonstrated that an inhibition effect on the  
313 crystallization kinetics was observed by using lauric acid and sucrose esters as additives. It  
314 was stated that this effect depends on the dissimilarity in molecular shape. The greater the  
315 difference in molecular structure between the additives and fats is, the more pronounced is the  
316 inhibition effect ([Chaleepa et al., 2010](#)). Minor components can also affect the crystal growth  
317 and polymorphism. In a similarity-dissimilarity concept, the minor components can either  
318 promote crystal growth by the formation of additional growth sites, or induce the adverse  
319 effect by blocking the growth sites by incorporating the molecules in the crystal structure. As

320 a consequence, a retardation of crystallization and/or change in crystal morphology occurs  
321 [\(Patel & Dewettinck, 2015; Rincòn-Cardona et al., 2014; Shimamura et al., 2013\).](#)

322 In our study, the addition of EsOF and EsOS inhibited the crystallization of PO as evidenced  
323 by the lower melting enthalpies reported in Fig. 1B. However, the effect of EsOF is more  
324 significant than the one observed for EsOS especially at lower crystallization temperatures.  
325 EsOF also inhibited the crystallization of the Mix sample, however, the EsOS promoted it  
326 (Fig. 1D). The greater delaying effect of EsOF is somehow expected based on the chemical  
327 composition of the EsO used in this study (Table 1) where the concentration of limonene in  
328 the EsOF is higher ( $4.05 \pm 0.02\%$ ) than that of EsOS ( $1.47 \pm 0.00\%$ ) ( $p < 0.05$ ). Other  
329 components present in the EsO used in our study might also contribute to the effect observed  
330 in PO and Mix crystallization. Two major compounds, namely  $\alpha$ -pinene and sabinene are at  
331 higher contents in EsOS (respectively of  $34.51 \pm 0.10\%$  and  $25.59 \pm 0.05\%$ ) compared to  
332 EsOF (respectively of  $27.93 \pm 0.03\%$  and  $17.05 \pm 0.04\%$ ) ( $p < 0.05$ ). It can be hypothesized  
333 that higher concentrations of these major compounds is responsible also in promoting  
334 crystallization in the Mix sample. In this context, an investigation of the individual effects of  
335 these molecules on crystallization of PO and other fats should be undertaken in the future to  
336 depict their effect on crystallization at different concentrations.

### 337 3.6. Solid Fat Content (SFC)

338 Fig. 2 depicts the change in SFC with time of crystallization for the samples of PO crystallized  
339 with and without the addition of 5% EsO from flowers and stems at temperatures of 20, 21,  
340 22, 23, and 24 °C. The SFC increased in all samples following a sigmoidal shape and were all  
341 well fitted to the Avrami equation ( $R^2 > 0.96$ ). At low temperatures ( $T_c = 20, 21,$  and  $22$  °C) a  
342 two-step crystallization process was observed without the presence of an induction period. As  
343  $T_c$  increases an induction period was observed and crystallization occurred in a single step.  
344 The main effect of adding the EsO is the drastic decrease in the SFC, a slower crystallization

345 rate ( $k$  values in Avrami fit), and a change in the nucleation mechanism ( $n$  values from  
346 Avrami fit). As expected, the SFC obtained at 60 min decreased as  $T_c$  increased in all samples  
347 (Table 2,  $p < 0.05$ ). The addition of EsO decreased the SFC significantly (Table 2,  $p < 0.05$ )  
348 but no differences were found between the two EsO tested. These results confirm the  
349 inhibition effect of the EsO towards the crystallization of PO. The decrease in the SFC values  
350 observed in Fig. 2 and Table 2 with the increase of temperature (from 20 to 24 °C) is due to  
351 the decrease of the supercooling. The driving force for a supercooled melt to undergo  
352 crystallization is determined by the degree of supercooling ([Ghotra et al., 2002](#)) and defines  
353 the way the nucleation occurs ([Herrera et al., 1999](#)). The higher the supercooling, the higher is  
354 the amount of solids in PO without addition of the EsO. The decrease in SFC with the  
355 addition of EsO is consistent with the melting behavior data (Fig. 1) where in general lower  
356 melting enthalpies were reported for samples crystallized with the addition of EsO. It was also  
357 observed that for the high supercoolings of 20, 21, and 22 °C, the induction periods are  
358 inexistent or very short whereas at low supercoolings of 23 and 24 °C an induction period  
359 does exist. It is reported that when no induction period is observed in samples crystallizing  
360 rapidly, both nucleation and growth events occur in a very short time and the nucleation rates  
361 are higher due to lower energy barriers of nucleation. As a consequence, numerous crystallites  
362 with a higher surface energy are formed. The opposite effect is observed when the  
363 supercoolings are low, leading to low nucleation rates and the formation of fewer crystallites  
364 ([Campos et al., 2002](#)). A decrease in SFC occurs with the addition of EsO even though the  
365 melting points are not different discarding the hypothesis of a possible dilution effect of the  
366 system by the EsO. Our hypothesis is that the diffusion of the TAGs in the crystal lattice is  
367 limited by the molecules of terpenes present in the EsO. Due to their small size and low  
368 molecular weight compared to TAGs, their mass transfer is favored in the crystal lattice and  
369 therefore compete for space in the crystalline lattice.

370 The inhibition effect of EsO towards the crystallization of PO is also evidenced by the lower  
371 rate constant,  $k$ , obtained from the Avrami fit. As expected,  $k$  values decreased with  
372 increasing  $T_c$  but they also decreased with the addition of the EsO indicating a slower  
373 crystallization kinetics. Finally, PO samples crystallized with the addition of EsO showed  
374 higher  $n$  values. The  $n$  value represents the index of the reaction and it is related to the  
375 nucleation and growth behavior of the sample. Values of  $n=1$  represent instantaneous  
376 nucleation,  $n$  values of 2 represent rod-like growth with sporadic nucleation or disc-like  
377 growth with instantaneous nucleation; while  $n$  values of 3 or 4 represent disc-like or  
378 spherulitic like growth. The addition of EsO had very little effect on  $n$  values at low  
379 temperatures (20 and 21 °C) with  $n$  values around 1 while an increase in  $n$  values from 1 to 2  
380 was observed at 22 °C, from 2 to 3 at 23 °C and from 2 to 4 at 24 °C. These changes in  $n$   
381 values suggest that the presence of EsO changes the nucleation and growth mechanism for PO  
382 from an instantaneous nucleation or rod-like morphology to a disk- or spherulite-like  
383 morphology.

384 SFC curves of Mix samples crystallized with and without the addition of EsO at 10, 13, 15,  
385 and 17 °C are depicted in Fig. 3. In Fig. 3A the crystallization behavior at 10 °C is shown for  
386 the Mix samples crystallized with and without EsO. It can be observed that crystallization  
387 starts with no induction time in the three samples and similar to the PO samples crystallized at  
388 low temperature the curves depict a two-step sigmoidal shape. The addition of EsO  
389 significantly decreased SFC values obtained at 60 min ( $p < 0.05$ , Table 2) but no significant  
390 differences were observed between the Mix samples with both EsO ( $p < 0.05$ ). At higher  
391 temperatures ( $T_c$  13, 15, and 17 °C, Fig. 3 B, C, and D) the effect of the addition of the EsO in  
392 Mix is more pronounced. The curves still have a sigmoidal shape but not as pronounced and  
393 in these cases a single-step curve was observed. In addition, an induction time was observed  
394 in all samples, with the longest induction time (30 min) observed in samples crystallized at 17



395 °C. It was reported that induction period and crystal development become longer at higher  
396 crystallization temperatures ([Miskandar et al., 2004](#)). Similar to the results discussed for PO  
397 an increase in crystallization temperature resulted in a decrease in SFC for all samples ( $p <$   
398  $0.05$ ). The effect of the addition of the EsO is notably observed at 17 °C and a slightly lower  
399 SFC can be observed for the Mix+EsOF compared to the other two samples. SFC shown in  
400 Fig. 3 were fitted to the Avrami equation. All curved results in a good fit ( $R^2 > 0.87$ ) with the  
401 exception of the curves obtained at 17 °C. This lack of fit is probably due to the lack of a  
402 sigmoidal curve in these samples. The Avrami fit shows that the addition of EsO decreased  
403 the crystallization rate ( $k$  value in Avrami parameter) and increased  $n$  values as previously  
404 discussed for the PO samples.

405 Overall, the addition of EsO to PO and the Mix samples decreased the  $SFC_{max}$  suggesting that  
406 the EsO interferes with the crystallization of these fats. These results corroborate the DSC  
407 discussion presented before where in general lower melting enthalpies were observed for  
408 samples with EsO. The exception to this behavior was the Mix+EsOS sample where higher  
409 enthalpies were observed. It is interesting to note that this sample has a slightly higher SFC  
410 compared to the sample with EsOF (Table 2,  $p > 0.05$ ) and only slightly lower than the ones  
411 observed for the Mix without EsO added (Table 2,  $p > 0.05$ ). Melting enthalpies are used to  
412 evaluate the amount of crystalline material present in the sample but also to evaluate the  
413 molecular interactions in the crystalline network. In the case of the Mix+EsOS it is possible  
414 that even though the crystallization is delayed, molecular interactions in the crystalline  
415 network formed resulted in higher enthalpy values. Perhaps a tighter crystalline network is  
416 formed under these conditions that require greater energy to melt the sample even when the  
417 amount of solid material (SFC) is similar. In addition, Fig. 3 shows that the effect of EsOS at  
418 delaying crystallization is less evident as the one observed for the EsOF, especially at higher  
419 crystallization temperatures (15 and 17 °C). The different effect of EsO observed for the PO

420 and Mix samples could be a consequence of the different TAG composition of the sample. It  
421 is our hypothesis that the terpenes present in EsOS interact less with the TAG present in the  
422 Mix sample having less effect on the crystallization process.

### 423 3.7. Polarized Light Microscopy

424 The morphology of crystals obtained for PO crystallized with and without the addition of EsO  
425 is shown in Supplementary material (Fig. S2) and the crystal sizes are reported in Table 3.

426 Crystals in PO grow bigger as the temperature increased (or the driving force decreases) from  
427 20 to 24 °C. At 20 °C, PO crystalline network is characterized by small spherical-shaped  
428 (spherulites) with a homogeneous distribution throughout the liquid oil. PO with EsOF and  
429 EsOS gives the same type of network with similar shape and number of crystals in both cases  
430 but slightly bigger. No significant differences were observed as a consequence of EsO  
431 addition for PO crystallized at 20 °C and 21 °C; however some differences are observed as  $T_c$   
432 increases. When PO is crystallized at 22 °C a significant increase in crystal size is observed  
433 for samples crystallized with EsOF ( $p < 0.01$ ). Fig. S2 shows that PO and PO+EsOS is  
434 composed by two population of crystals of different sizes. The lack of a population of smaller  
435 crystals in PO+EsOF results in a bigger crystal size as reported in Table 3. PO and PO+EsOF  
436 samples crystallized at 23 °C had bigger crystal sizes compared to PO+EsOS samples (Table  
437 3,  $p < 0.05$ ). As previously discussed the smaller average crystal size reported for PO+EsOS  
438 is due to the presence of a significant amount of smaller crystals (Fig. S2). Lastly, PO+EsOF  
439 and PO+EsOS crystallized at 24 °C had similar crystals sizes ( $p > 0.05$ ) which were larger  
440 than the ones obtained for the PO. Overall these results show that the addition of EsO to PO  
441 either increases the crystal size or has no effect depending on the  $T_c$  used. Larger crystal sizes  
442 are a consequence of the delay in the crystallization that these EsO have on the PO.

443 Pictures of crystals obtained for Mix samples crystallized with and without the addition of  
444 EsO are shown in supplementary material (Fig. S3). Crystals were characterized by small  
445 spherulites which grew as the crystallization temperature increased. Crystals obtained in the  
446 Mix samples were noticeably smaller compared to the ones obtained for the PO samples. The  
447 addition of EsO did not affect crystal size of the Mix when crystallized at 10-13 °C and at 20  
448 °C (Table 3). Significantly smaller crystals ( $p < 0.01$ ) were obtained when Mix sample were  
449 crystallized with EsOF at 17 °C.

450 These results support the SFC previously reported where the increase of temperature lowers  
451 the SFC of the samples and a melt of crystals predominates. The addition of the EsOF and  
452 EsOS in Mix resulted in a change in crystallization behavior and the appearance of a totally  
453 different microstructure in the samples.

#### 454 **4. Conclusions**

455 The EsO of *P. scoparius* extracted from the aerial part of the plant (flowers and stems)  
456 obtained by the process of hydrodistillation modified the crystallization behavior of PO and a  
457 mixture of PO, SFO, and SBO oils. The results of DSC and p-NMR suggest a delay in the  
458 crystallization process at the different crystallization temperatures investigated and a  
459 reduction of solid fat content (SFC), which in turn affected their microstructure and crystal  
460 morphology. The complex terpene composition of the EsO is likely responsible for the  
461 changes observed in the samples. Taking into account that the melting points of the samples  
462 were not affected by the addition of EsO it is our hypothesis that the EsO delay the  
463 crystallization of these fats by either steric hindrance or by competition between TAG  
464 molecules and terpene molecules on nucleation sites. Even though both EsO tested in this  
465 research delayed crystallization EsOS was less effective at doing so when used in the Mix  
466 sample. It is likely that these differences are due to the different composition of the EsO and  
467 their interaction with the different TAG molecules present in the samples. More research is to

468 be conducted to assess the effect and contribution of single terpenes and their mixtures on the  
469 crystallization behavior of fats. The results from this research shows that if EsO are to be used  
470 as antioxidants for shortening applications careful consideration has to be taken to ensure that  
471 the physical properties of the material are not changed due to the change in the crystallization  
472 behavior of the sample related to EsO addition.

#### 473 **Conflict of interest**

474 No conflict of interest is to declare by the authors.

#### 475 **Acknowledgments**

476 We gratefully acknowledge the financial support from INATAA, Université Frères Mentouri  
477 Constantine 1, Algeria. This work was also conducted within the framework of the budget  
478 project for Borekov Institute of Catalysis, Russian Federation. This research was supported  
479 by the Utah Agricultural Experiment Station, Utah State University, and approved as journal  
480 paper number 9105.

481 The authors would like to give a vibrant tribute in loving memory of Dr. Louaileche H., full  
482 professor at the department of Food Sciences, faculty of Life Sciences, University of A/MIRA  
483 of Béjaia, Algeria. This work is dedicated to her for the passionate and accomplished scientist  
484 she was. You will never be forgotten.

#### 485 **References**

- 486 Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant Activity of Essential Oils.  
487 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10835-10847.
- 488 Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential  
489 oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.

490 Campos, R., Narine, S., & Marangoni, A. (2002). Effect of cooling rate on the structure and  
491 mechanical properties of milk fat and lard. *Food Research International*, 35(10), 971-981.

492 Chaleepa, K., Szepes, A., & Ulrich, J. (2010). Effect of additives on isothermal crystallization  
493 kinetics and physical characteristics of coconut oil. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(4–  
494 5), 390-396.

495 Chiavaro, E. (2014). *Differential scanning calorimetry: applications in fat and oil technology*:  
496 CRC Press.

497 Chikhoun, A., Damjan Pavleca, J., Shashkov, M., Berroua, Z., Chebbi, K., Bougherra, H.,  
498 Zeroual, B., Aliane, K., Gagaoua, M., & Boudjellal, A. (2017). Antioxidant effect induced by  
499 the essential oil of *Pituranthos scoparius* in a formulation of a whey spread emulsion. *Journal*  
500 *of food processing and preservation*, 41(5), e13163.

501 da Silva, R. C., Soares, F. A. S. D. M., Maruyama, J. M., Dagostinho, N. R., Silva, Y. A.,  
502 Ract, J. N. R., & Gioielli, L. A. (2016). Microscopic approach of the crystallization of  
503 tripalmitin and tristearin by microscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 198, 1-9.

504 De Graef, V., Dewettinck, K., Verbeken, D., & Foubert, I. (2006). Rheological behavior of  
505 crystallizing palm oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(10), 864-870.

506 Do, T.-A., Vieira, J., Hargreaves, J., Wolf, B., & Mitchell, J. (2008). Impact of limonene on  
507 the physical properties of reduced fat chocolate. *Journal of the American Oil Chemists'*  
508 *Society*, 85(10), 911-920.

509 Ghotra, B. S., Dyal, S. D., & Narine, S. S. (2002). Lipid shortenings: a review. *Food Research*  
510 *International*, 35(10), 1015-1048.

511 Gunstone, F. D., Harwood, J. L., & Dijkstra, A. J. (2007). *The lipid handbook with CD-ROM*:  
512 CRC press.

513 Herrera, M. L., Falabella, C., Melgarejo, M., & Añón, M. C. (1999). Isothermal crystallization  
514 of hydrogenated sunflower oil: II. Growth and solid fat content. *Journal of the American Oil*  
515 *Chemists' Society*, 76(1), 1-6.

516 Lograda, T., Ramdani, M., Kiram, A., Chalard, P., & Figueredo, G. (2013). Variation of  
517 essential oils composition of *Pituranthos scoparius* in Algeria. *Global J Res. Med. Plants &*  
518 *Indigen. Med*, 2(1), 1-9.

519 Martini, S., Herrera, M., & Hartel, R. (2001). Effect of cooling rate on nucleation behavior of  
520 milk fat– sunflower oil blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3223-  
521 3229.

522 Mba, O. I., Dumont, M.-J., & Ngadi, M. (2015). Palm oil: Processing, characterization and  
523 utilization in the food industry – A review. *Food Bioscience*, 10, 26-41.

524 McCarthy, J. F., & Cramb, R. A. (2009). Policy narratives, landholder engagement, and oil  
525 palm expansion on the Malaysian and Indonesian frontiers. *The Geographical Journal*, 175(2),  
526 112-123.

527 Meng, Z., Liu, Y.-F., Jin, Q.-Z., Huang, J.-H., Song, Z.-H., Wang, F.-Y., & Wang, X.-G.  
528 (2011). Comparative analysis of lipid composition and thermal, polymorphic, and  
529 crystallization behaviors of granular crystals formed in beef tallow and palm oil. *Journal of*  
530 *Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1432-1441.

531 Miskandar, M., Che Man, Y., Abdul Rahman, R., Nor Aini, I., & Yusoff, M. (2004). Palm oil  
532 crystallization: effects of cooling time and oil content. *Journal of Food Lipids*, 11(3), 190-207.

533 Miyasaki, E. K., Santos, C. A. d., Vieira, L. R., Ming, C. C., Calligaris, G. A., Cardoso, L. P.,  
534 & Gonçalves, L. A. G. (2015). Acceleration of polymorphic transition of cocoa butter and

535 cocoa butter equivalent by addition of d-limonene. *European Journal of Lipid Science and*  
536 *Technology*.

537 O'brien, R. D. (2008). *Fats and oils: formulating and processing for applications*: CRC press.

538 Patel, A. R., & Dewettinck, K. (2015). Current update on the influence of minor lipid  
539 components, shear and presence of interfaces on fat crystallization. *Current Opinion in Food*  
540 *Science*, 3, 65-70.

541 Pérez-Rosés, R., Risco, E., Vila, R., Peñalver, P., & Cañigüeral, S. (2016). Biological and  
542 nonbiological antioxidant activity of some essential oils. *Journal of Agricultural and Food*  
543 *Chemistry*, 64(23), 4716-4724.

544 Ray, J., MacNaughtan, W., Chong, P. S., Vieira, J., & Wolf, B. (2012). The effect of  
545 limonene on the crystallization of cocoa butter. *Journal of the American Oil Chemists'*  
546 *Society*, 89(3), 437-445.

547 Rigolle, A., Goderis, B., Van Den Abeele, K., & Foubert, I. (2016). Isothermal Crystallization  
548 Behavior of Cocoa Butter at 17 and 20° C with and without Limonene. *Journal of Agricultural*  
549 *and Food Chemistry*, 64(17), 3405-3416.

550 Rincón-Cardona, J. A., Agudelo-Laverde, L. M., Martini, S., Candal, R. J., & Herrera, M. L.  
551 (2014). In situ synchrotron radiation X-ray scattering study on the effect of a stearic sucrose  
552 ester on polymorphic behavior of a new sunflower oil variety. *Food Research International*,  
553 64, 9-17.

554 Shimamura, K., Ueno, S., Miyamoto, Y., & Sato, K. (2013). Effects of polyglycerine fatty  
555 acid esters having different fatty acid moieties on crystallization of palm stearin. *Crystal*  
556 *Growth & Design*, 13(11), 4746-4754.

557 Smith, K. W., Bhaggan, K., Talbot, G., & van Malssen, K. F. (2011). Crystallization of Fats:  
558 Influence of Minor Components and Additives. *Journal of the American Oil Chemists'*  
559 *Society*, 88(8), 1085-1101.

560 Toro-Vazquez, J. F., Dibildox-Alvarado, E., Charó-Alonso, M., Herrera-Coronado, V., &  
561 Gómez-Aldapa, C. A. (2002). The Avrami index and the fractal dimension in vegetable oil  
562 crystallization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(9), 855-866.

563  
564

### 565 **Figure captions**

566 **Fig. 1.** Melting behavior of PO (A, B) and Mix (C, D) samples crystallized with and without  
567 the addition of EsO. Peak temperatures ( $T_p$ , A, C) and change in enthalpy associated with the  
568 melting process ( $\Delta H$ , B, D). Mean values and standard errors of 3 independent runs are  
569 reported. Mean values with the same letter are not statistically different ( $\alpha = 0.05$ ).

570 **Fig. 2.** Isothermal solid fat content (SFC) as a function of time determined by p-NMR at 20°C  
571 (A), 21°C (B), 22°C (C), 23°C (D), and 24°C (E) for PO samples crystallized with and  
572 without EsO. Parameters obtained from the Avrami fit are presented in a table below each  
573 plot.

574 **Fig. 3.** Isothermal solid fat content (SFC) as a function of time determined by p-NMR at 10°C  
575 (A), 13°C (B), 15°C (C), and 17°C (D) for Mix samples crystallized with and without EsO.  
576 Parameters obtained from the Avrami fit are presented in a table below each plot.

577



**Table 1**

Chemical profile of the essential oils of *Pituranthos scoparius* extracted from flowers (EsOF) and stems (EsOS) and obtained by hydrodistillation.

Compound of the essential oil*	Flowers (EsOF) (%)**	Stems (EsOS) (%)**	p-value
$\alpha$ -Pinene	27.93 $\pm$ 0.03	34.51 $\pm$ 0.10	0.000122
Sabinene	17.05 $\pm$ 0.04	25.59 $\pm$ 0.05	0.000043
Apiol	7.38 $\pm$ 0.01	n.d.	n.d.
$\beta$ -Pinene	3.04 $\pm$ 0.01	5.27 $\pm$ 0.01	0.000025
3-Carene	5.18 $\pm$ 0.01	5.38 $\pm$ 0.01	0.002961
Limonene	4.05 $\pm$ 0.02	1.47 $\pm$ 0.00	0.000034
Germacrene	3.57 $\pm$ 0.01	0.38 $\pm$ 0.00	0.000002
p-Cymene	2.57 $\pm$ 0.07	4.46 $\pm$ 0.01	0.000727
$\beta$ -Ocimene	1.36 $\pm$ 0.01	3.38 $\pm$ 0.06	0.000396
$\beta$ -Thujene	1.61 $\pm$ 0.04	3.92 $\pm$ 0.01	0.000121
Terpinen-4-ol	3.69 $\pm$ 0.01	2.74 $\pm$ 0.07	0.002868
cis- $\beta$ -Terpineol	3.11 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.00	0.000011
$\alpha$ -Phellandrene	2.92 $\pm$ 0.01	1.43 $\pm$ 0.00	0.000011
trans-ligustilide	2.04 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
(-)-Spathulenol	0.48 $\pm$ 0.00	1.84 $\pm$ 0.01	0.000013
$\gamma$ -Terpinene	1.18 $\pm$ 0.03	1.71 $\pm$ 0.06	0.007045
Myristicin	1.44 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Cadinol	n.d.	1.28 $\pm$ 0.01	n.d.
$\beta$ -Eudesmol	1.06 $\pm$ 0.01	0.63 $\pm$ 0.00	0.000138
$\beta$ -Myrcene	0.96 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.00	0.019804
(+)- $\delta$ -Cadinene	0.87 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
$\delta$ -Cadinene	n.d.	0.38 $\pm$ 0.00	n.d.
$\alpha$ -Terpinene	0.50 $\pm$ 0.00	0.76 $\pm$ 0.00	n.d.
Terpinolene	n.d.	0.56 $\pm$ 0.05	n.d.
Bornyl acetate	0.59 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
Borneol	0.55 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
Butylidenephthalide	0.52 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
Spathulenol	0.48 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
$\alpha$ -Selinene	0.33 $\pm$ 0.01	n.d.	n.d.
cis-Verbenol	0.29 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.00	n.d.
Caryophyllene oxide	n.d.	0.25 $\pm$ 0.00	n.d.
cis-Sabinol	0.22 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.00	n.d.
Camphene	0.20 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.00	n.d.
trans-Z- $\alpha$ -Bisabolene epoxide	n.d.	0.07 $\pm$ 0.00	n.d.
trans-p-2-Menthen-1-ol	0.18 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
Pinocarveol	0.16 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
trans-Pinocarveol	n.d.	0.16 $\pm$ 0.00	n.d.
Lanceol, cis	n.d.	0.16 $\pm$ 0.00	n.d.
$\gamma$ -Elemene	0.16 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
Humulene	0.15 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
Copaene	n.d.	0.16 $\pm$ 0.00	n.d.
cis- $\beta$ -Farnesene	0.13 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
$\beta$ -Farnesene	0.09 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
p-Cymen-8-ol	0.11 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.00	n.d.
$\alpha$ -Terpineol	0.14 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.

$\alpha$ -Bourbonene	0.10 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
Longipinene epoxide	0.10 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
Dihydroedulan	0.09 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
$\gamma$ -Muurolene	0.08 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
cis-Ocimene	0.08 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
cis-Verbenol	0.29 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
Verbenone	0.09 $\pm$ 0.00	n.d.	n.d.
Verbenol	n.d.	0.07 $\pm$ 0.00	n.d.
Pinocarvone	n.d.	0.06 $\pm$ 0.00	n.d.
2,6-Dimethyl-3,5,7-octatriene-2-ol, ,E,E	n.d.	0.06 $\pm$ 0.01	n.d.
$\alpha$ -Campholenal	n.d.	0.05 $\pm$ 0.00	n.d.
$\alpha$ -Calacorene	n.d.	0.05 $\pm$ 0.00	n.d.
$\alpha$ -Phellandren-8-ol	n.d.	0.04 $\pm$ 0.00	n.d.
trans-Piperitol	n.d.	0.04 $\pm$ 0.00	n.d.
Dehydrosabinene	n.d.	0.04 $\pm$ 0.00	n.d.
Total compounds unidentified	2.02	0.60	

n.d: not determined.

\*Compounds of the essential oils listed in order of elution from a HP-5ms fused silica capillary column.

\*\*A paired T-test was applied and the data obtained from the essential oils of *P. scoparius* samples (EsOF and EsOS) were treated as independent groups ( $\alpha = 0.05$ ).

**Table 2**

SFC obtained at 60 min of PO and Mix with and without the addition of EsO from flowers (EsOF) and stems (EsOS).

<b>T<sub>c</sub> (°C)</b>	<b>PO</b>	<b>PO + EsOF</b>	<b>PO + EsOS</b>
<b>20</b>	17.00 ± 0.08 <sup>a</sup>	13.82 ± 0.19 <sup>c</sup>	14.00 ± 0.08 <sup>c</sup>
<b>21</b>	15.64 ± 0.23 <sup>b</sup>	12.55 ± 0.25 <sup>d</sup>	12.81 ± 0.21 <sup>d</sup>
<b>22</b>	14.15 ± 0.24 <sup>c</sup>	11.72 ± 0.30 <sup>e</sup>	11.81 ± 0.26 <sup>e</sup>
<b>23</b>	12.94 ± 0.08 <sup>d</sup>	10.93 ± 0.24 <sup>f</sup>	10.73 ± 0.27 <sup>f</sup>
<b>24</b>	11.82 ± 0.35 <sup>e</sup>	9.66 ± 0.55 <sup>g</sup>	9.99 ± 0.09 <sup>g</sup>
	<b>Mix</b>	<b>Mix + EsOF</b>	<b>Mix + EsOS</b>
<b>10</b>	4.37 ± 0.17 <sup>a</sup>	3.55 ± 0.03 <sup>b,c</sup>	3.75 ± 0.08 <sup>b</sup>
<b>13</b>	3.27 ± 0.03 <sup>c,d</sup>	2.89 ± 0.16 <sup>e</sup>	2.98 ± 0.18 <sup>d,e</sup>
<b>15</b>	3.01 ± 0.16 <sup>d,e</sup>	2.19 ± 0.16 <sup>f,g</sup>	2.52 ± 0.15 <sup>f</sup>
<b>17</b>	1.76 ± 0.25 <sup>h</sup>	0.87 ± 0.50 <sup>i</sup>	2.06 ± 0.17 <sup>g,h</sup>

Results are presented as means ± SD of three replicates. Means not sharing the same letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

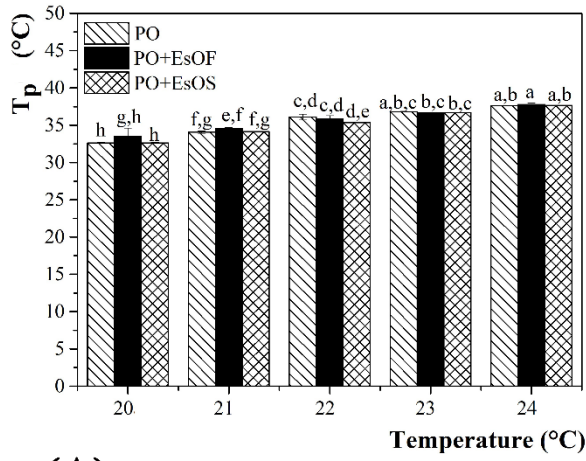
**Table 3**

Crystal size (radius,  $\mu\text{m}$ ) obtained for PO and Mix samples crystallized with and without the addition of EsO after 60 min of crystallization at  $T_c$ .

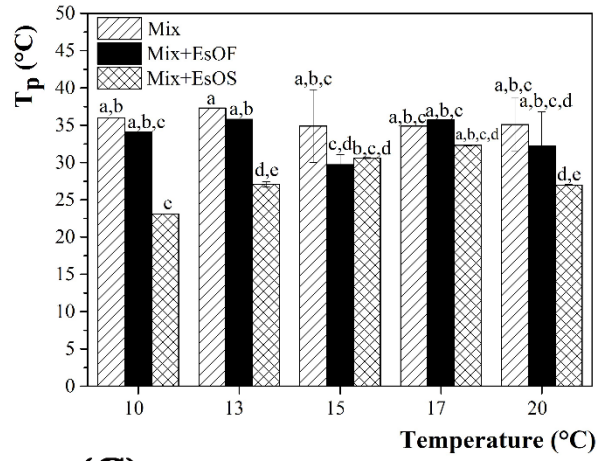
$T_c$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	<b>PO</b>	<b>PO+EsOF</b>	<b>PO+EsOS</b>
<b>20</b>	$4.7 \pm 2.2^a$	$10.2 \pm 1.7^a$	$7.2 \pm 0.5^a$
<b>21</b>	$7.1 \pm 1.4^a$	$10.7 \pm 1.1^a$	$8.2 \pm 1.6^a$
<b>22</b>	$9.3 \pm 0.4^a$	$17.2 \pm 3.5^b$	$7.1 \pm 0.6^a$
<b>23</b>	$17.5 \pm 1.3^a$	$22.9 \pm 0.6^a$	$10.9 \pm 1.7^b$
<b>24</b>	$12.2 \pm 2.4^c$	$19.0 \pm 1.0^{a,b}$	$17.6 \pm 0.6^b$
	<b>Mix</b>	<b>Mix+EsOF</b>	<b>Mix+EsOS</b>
<b>10</b>	$3.8 \pm 1.0^a$	$4.4 \pm 0.5^a$	$4.6 \pm 0.6^a$
<b>13</b>	$3.9 \pm 0.5^a$	$4.6 \pm 0.5^a$	$4.8 \pm 0.7^a$
<b>15</b>	$5.1 \pm 0.6^a$	$7.2 \pm 1.2^a$	$5.7 \pm 0.4^a$
<b>17</b>	$11.6 \pm 0.8^a$	$3.7 \pm 1.0^b$	$8.8 \pm 0.2^{a,b}$
<b>20</b>	$14.1 \pm 1.6^a$	$12.5 \pm 2.8^a$	$10.7 \pm 3.1^a$

Mean values and standard deviation of the means are reported ( $n = 3$ ).

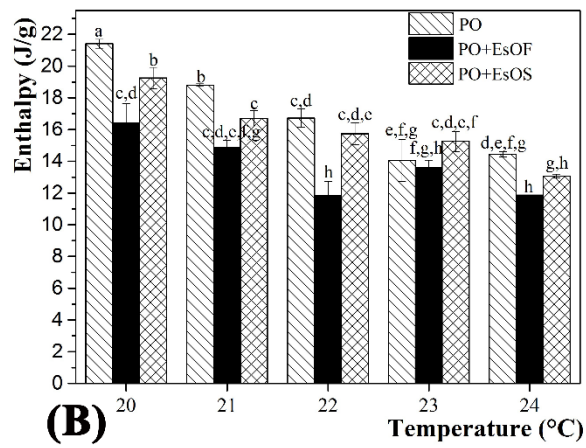
Within a row, values followed by the same superscript letter are not significantly different ( $\alpha = 0.05$ )



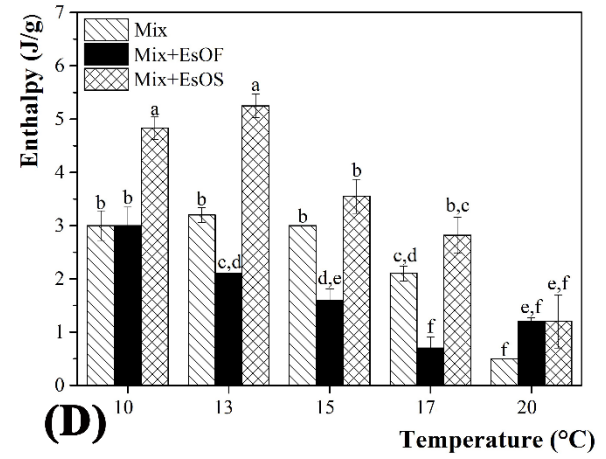
(A)



(C)

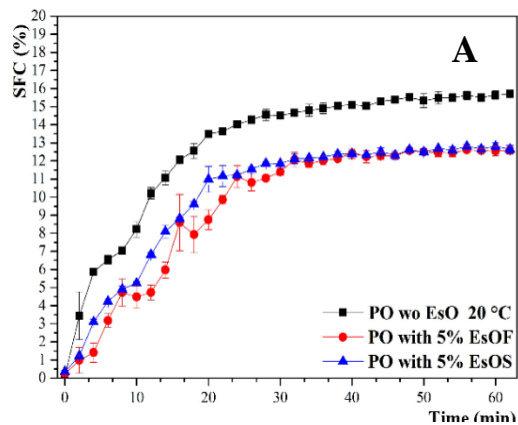


(B)

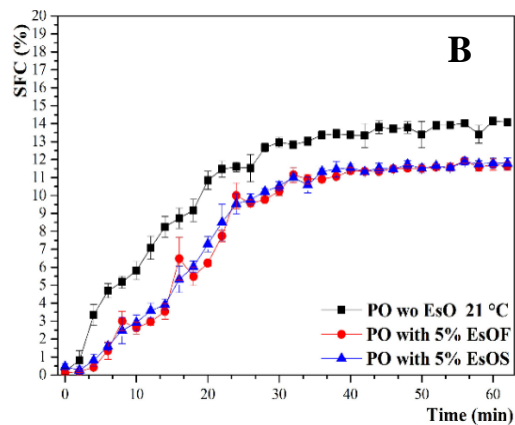


(D)

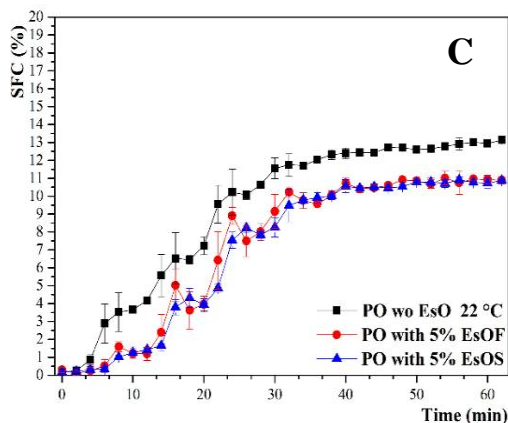
Fig. 1.



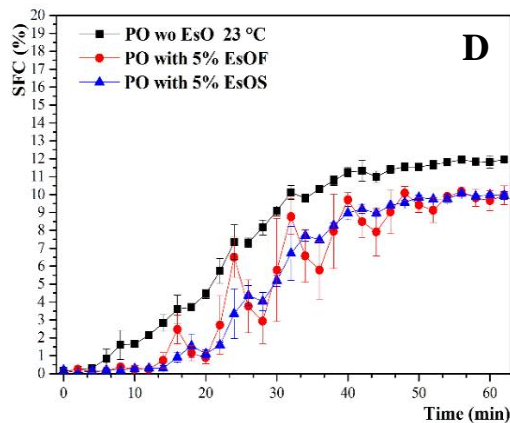
20 °C	$k$ (min <sup>-n</sup> )	$n$	SFC <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>
PO	0.1584 ± 0.0101	0.78 ± 0.03	18.19 ± 0.20	0.9815
PO + EsOF	0.0648 ± 0.0045	1.12 ± 0.03	13.91 ± 0.07	0.9906
PO + EsOS	0.0942 ± 0.0066	1.00 ± 0.03	14.01 ± 0.08	0.9869



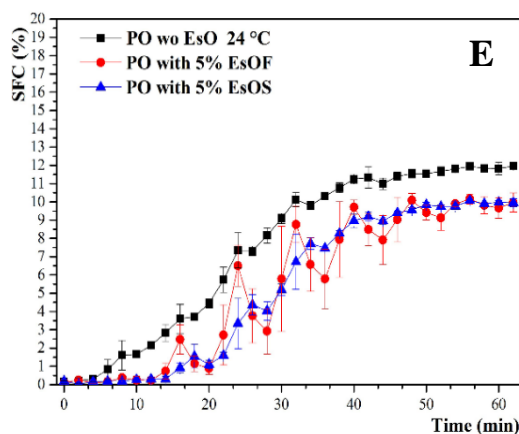
21 °C	$k$ (min <sup>-n</sup> )	$n$	SFC <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>
PO	0.0999 ± 0.0068	0.95 ± 0.03	15.75 ± 0.12	0.9866
PO + EsOF	0.0173 ± 0.0028	1.44 ± 0.06	12.63 ± 0.12	0.9778
PO + EsOS	0.0343 ± 0.0030	1.29 ± 0.03	12.68 ± 0.07	0.9901



22 °C	$k$ (min <sup>-n</sup> )	$n$	SFC <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>
PO	0.0397 ± 0.0039	1.18 ± 0.04	14.08 ± 0.12	0.9854
PO + EsOF	0.0027 ± 0.0006	1.96 ± 0.08	11.64 ± 0.107	0.9802
PO + EsOS	0.0029 ± 0.0005	1.95 ± 0.06	11.71 ± 0.08	0.9886

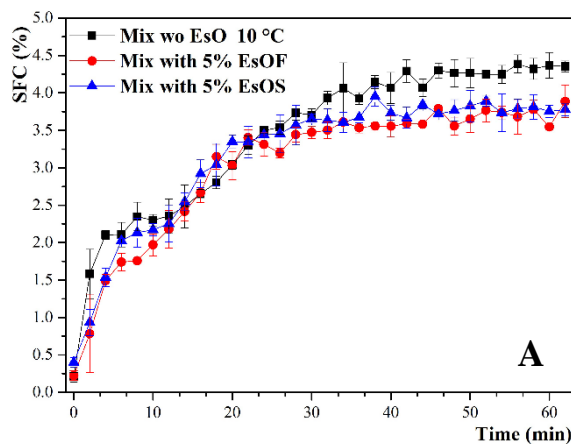


23 °C	$k$ (min <sup>-n</sup> )	$n$	SFC <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>
PO	0.0090 ± 0.0017	1.57 ± 0.06	13.02 ± 0.14	0.9790
PO + EsOF	4.7 × 10 <sup>-4</sup> ± 2.0 × 10 <sup>-4</sup>	2.43 ± 0.14	10.79 ± 0.13	0.9675
PO + EsOS	3.0 × 10 <sup>-4</sup> ± 8.6 × 10 <sup>-5</sup>	2.54 ± 0.09	10.74 ± 0.09	0.9870

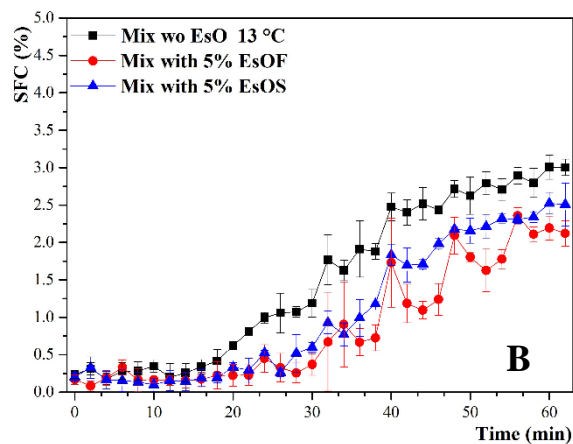


24 °C	$k$ (min <sup>-n</sup> )	$n$	SFC <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>
PO	8.2 × 10 <sup>-4</sup> ± 1.7 × 10 <sup>-4</sup>	2.18 ± 0.07	11.87 ± 0.10	0.9897
PO + EsOF	6.7 × 10 <sup>-5</sup> ± 6.6 × 10 <sup>-5</sup>	2.78 ± 0.30	9.83 ± 0.33	0.8987
PO + EsOS	3.3 × 10 <sup>-5</sup> ± 1.7 × 10 <sup>-5</sup>	3.65 ± 0.15	9.82 ± 0.97	0.9866

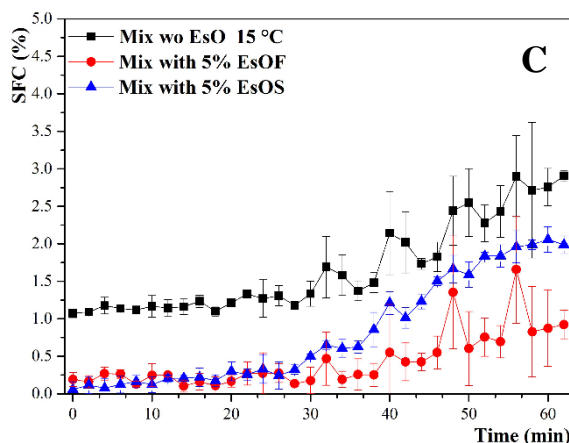
Fig. 2



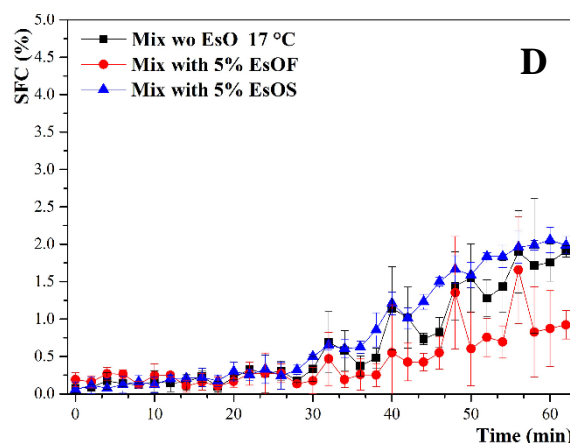
10 °C	$k$ (min <sup>-2</sup> )	$n$	SFC <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>
Mix	0.1065 ± 0.06	0.40 ± 0.06	10.60 ± 6.65	0.9542
Mix + EsOF	0.1142 ± 0.0123	0.87 ± 0.05	3.82 ± 0.06	0.9596
Mix + EsOS	0.1408 ± 0.014	0.82 ± 0.05	3.93 ± 0.06	0.9570



13 °C	$k$ (min <sup>-2</sup> )	$n$	SFC <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>
Mix	0.0248 ± 0.0035	1.22 ± 0.05	3.50 ± 0.06	0.9765
Mix + EsOF	6.8 × 10 <sup>-4</sup> ± 2.0 × 10 <sup>-4</sup>	2.15 ± 0.10	2.96 ± 0.05	0.9792
Mix + EsOS	0.0033 ± 9.8 × 10 <sup>-4</sup>	1.75 ± 0.10	3.07 ± 0.06	0.9641



15 °C	$k$ (min <sup>-2</sup> )	$n$	SFC <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>
Mix	1.4 × 10 <sup>-4</sup> ± 6.6 × 10 <sup>-5</sup>	2.47 ± 0.15	3.04 ± 0.09	0.9653
Mix + EsOF	7.0 × 10 <sup>-4</sup> ± 1.0 × 10 <sup>-5</sup>	3.07 ± 0.43	2.50 ± 0.35	0.8672
Mix + EsOS	1.8 × 10 <sup>-4</sup> ± 1.4 × 10 <sup>-4</sup>	3.56 ± 0.23	2.52 ± 0.08	0.9604



17 °C	$k$ (min <sup>-2</sup> )	$n$	SFC <sub>max</sub>	R <sup>2</sup>
Mix	N/A	N/A	N/A	N/A
Mix + EsOF	N/A	N/A	N/A	N/A
Mix + EsOS	N/A	N/A	N/A	N/A

Fig. 3.

**Supplementary Material**

[Click here to download Supplementary Material: Supplementary material Table 1.docx](#)



**Supplementary Material**

[Click here to download Supplementary Material: Supplementary material Table 2.docx](#)

**Supplementary Material**

[Click here to download Supplementary Material: Supplementary material Fig S1.docx](#)

**Supplementary Material**

[Click here to download Supplementary Material: Supplementary material Fig S2.docx](#)

**Supplementary Material**

[Click here to download Supplementary Material: Supplementary material Fig S3.docx](#)

# Discussion générale

## **1. Contribution de la spectrophotométrie dans l'évaluation de la teneur en polyphénols**

Avant de procéder au dosage des différents antioxydants, une étape d'extraction préalable a été réalisée en vue de doser les différents antioxydants. Les polyphénols de *P. scoparius* et *H. sabdariffa* ont été extraits par simple extraction conventionnelle (décoction) (**Publication n°3**) et par de techniques non conventionnelles (microondes et ultrasons) (**Publication n°2**) respectivement. Le procédé d'extraction implique plus ou moins une agitation vigoureuse du matériel végétal en poudre, en utilisant un solvant d'extraction à température ambiante ou élevée et la séparation subséquente de l'extrait brut du résidu d'extraction par filtration. Des étapes d'extraction répétées peuvent être accomplies pour augmenter le rendement d'extraction. Le but de l'extraction est de concentrer les composés antioxydants de la matière végétale brute, de sorte que le produit d'extraction soit incorporé dans l'aliment à de faibles quantités (Tzia et Liadakis, 2003).

La masse de la matière végétale ainsi que la forme de la plante utilisée (coupée ou en poudre) ont été investiguées pour *P. scoparius*. Elles ont montré un effet significatif sur la teneur en polyphénols totaux. Les polyphénols totaux et le pouvoir réducteur des extraits aqueux sont significativement affectés par la masse de la matière végétale. Cependant, la teneur en flavonoïdes n'est pas augmentée par l'augmentation de la matière végétale ( $p < 0,05$ ) (**Tableau 1, Publication n°3**).

L'effet du solvant est évident dans l'évaluation de la teneur en polyphénols totaux de l'*H. sabdariffa*, dont l'ordre des extraits est le suivant : acétone 80% > eau > méthanol 80% ( $p < 0,05$ ). Dans le cas des flavonoïdes, des teneurs élevées sont obtenues par utilisation de l'eau comme solvant d'extraction. Dans le cas des anthocyanines, les extraits obtenus par microondes ont montré des teneurs plus élevées comparés à ceux des extraits issus par ultrasons ( $p < 0,05$ ). L'ordre croissant des teneurs en anthocyanines dans les extraits est le suivant : eau > acétone 80% > méthanol 80% ( $p < 0,05$ ). Le pouvoir réducteur des extraits aqueux est bien plus élevé que ceux des extraits hydroacétoniques et hydroalcooliques ( $p < 0,05$ ).

Les propriétés antioxydantes des polyphénols proviennent de leur haute réactivité en qualité de donneurs de protons ou d'électrons, de la capacité du radical polyphénolique formé à délocaliser et à stabiliser l'électron impair (fonction des polyphénols briseurs de chaîne) et de leur potentiel à chélater les ions métalliques (fonction de terminaison de la réaction de Fenton) (Rice-Evans *et al.*, 1997 ; Chanda et Dave, 2009). L'activité antioxydante des flavonoïdes et de leurs métabolites *in vitro* dépendent de l'arrangement des groupements fonctionnels sur leurs

structures. Cet arrangement spatial des substituants est probablement l'un des grands déterminants de l'activité antioxydante du squelette flavane. La configuration et le nombre des groupements hydroxyles influencent sensiblement les divers mécanismes antioxydants. La configuration de l'hydroxyle de l'anneau B est aussi un des déterminants du scavenging des ERO. Le groupement hydroxyle de l'anneau B donne un hydrogène et un électron aux radicaux hydroxyles, peroxydes et peroxy-nitrites les stabilisant et donnant lieu à un radical flavonoïde stable. La structure 3'4'-catéchol dans l'anneau B augmente significativement l'inhibition de la peroxydation lipidique. L'hétérocycle des flavonoïdes contribue également à l'activité antioxydante par : *i*) la présence d'un 3-OH libre et *ii*) la possibilité de conjugaison entre les noyaux aromatiques. L'anneau C n'est pas une composante importante dans le processus antioxydant des flavonoïdes, puisque les chalcones sont dotés d'activité antioxydante (Mora *et al.*, 1990 ; Cao *et al.*, 1997 ; Burda et Oleszek, 2001 ; Pannala *et al.*, 2001 ; Heim *et al.*, 2002).

## **2. Contribution de la chromatographie dans les analyses fines des échantillons étudiés**

A ce jour, il n'existe pas une technique de séparation aussi puissante et performante que la chromatographie. C'est la technique la plus versatile et répandue employée en chimie analytique moderne. Plusieurs raisons expliquent cette suprématie : *i*) l'existence de méthodes de détection très sensibles pour les différentes chromatographies, *ii*) de faibles quantités des échantillons peuvent être analysées, *iii*) technique relativement simple, rapide et assez précise quand l'appareillage fait l'objet d'une maintenance régulière. Elle désigne un groupe de techniques utilisées pour la séparation de mélanges complexes de molécules, en fonction de leur distribution entre deux phases (Srivastava, 2010).

### **2.1. TLC/HPTLC**

Dans le cadre de ce travail de thèse, différentes techniques chromatographiques ont été abordées et ayant pour objectif la détermination de la composition fine des composés mineurs dans les plantes et les huiles végétales étudiées. Le choix de la technique chromatographique dans ce qui suit s'est reposé sur un double objectif : un screening rapide des molécules bioactives présentes dans les échantillons et une caractérisation approfondie de celles-ci. Le plus souvent, le recours à plusieurs techniques chromatographiques permet de dresser un meilleur portrait quant à la présence d'un groupe de molécules ainsi que les molécules individuelles qui les composent. La stratégie chromatographique a consisté d'abord à un screening des composés bioactifs des échantillons de la présente étude. Pour ce faire, des screenings sur TLC et HPTLC ont été réalisés pour la visualisation de la composition sommaire en ces composés dans les

différents échantillons, mais aussi l'observation des fractions les plus actives en termes d'activité antioxydante au sein du mélange des composés séparés.

La TLC a été notamment préférée dans le cas de la visualisation des composés terpéniques au sein des huiles essentielles de *P. scoparius* (**Figure 1a ; Publication n°1**). La séparation chromatographique sur les deux types de plaques utilisés (TLC et HPTLC) a donné lieu à des profils chromatographiques particuliers pour celles-ci. Plusieurs bandes de couleurs et d'intensités différentes ont été révélées, montrant une différence visible au niveau de la partie supérieure de la plaque développée. Il a été constaté une résolution pour la séparation différente lors de l'application des huiles essentielles sur couche mince standard (TLC) et sur couche mince haute performance (HPTLC). La fixation des terpénoïdes sur les deux supports de gel de silice a été de toute évidence influencée non seulement par la taille des particules correspondantes aux deux phases stationnaires étudiées, mais aussi par le premier solvant de développement utilisé (l'isooctane). Cette influence s'est exprimée par un élargissement des bandes au niveau de la partie supérieure de la plaque, qui démontre la richesse de l'huile essentielle FP en terpénoïdes en comparaison avec l'huile essentielle DP. Cet effet d'élargissement des bandes semble être inévitable lors du développement des plaques chromatographiques (Zlatkis et Kaiser, 2011). Les deux types de plaques ont été développés dans des chambres de développement chromatographiques, sans pré-saturation préalable par le système de développement (Figure 24). Suite à des tests préliminaires au laboratoire, il a été constaté qu'une meilleure résolution pour la séparation a été obtenue pour les plaques ayant été développées dans des chambres de développement non sujettes à une pré-saturation par le système de solvants utilisé (n-hexane-acétate d'éthyle 5 :1, v/v). Une analyse densitométrique, effectuée non dans un but de quantification, a été réalisée sur les huiles essentielles étudiées (**Figure 2a, Publication n°1**). L'utilisation de standards de monoterpènes (**Figure 2b, Publication n°1**) et de la plaque HPTLC n'a pas permis de dresser un profil terpénique complet, mais a surtout permis une évaluation qualitative sommaire sur les monoterpènes pouvant être présents. Les densitogrammes obtenus, bien que non résolus de manière claire, donne une idée sur les composés pouvant se trouver dans le mélange complexe des terpénoïdes qui caractérisent les huiles essentielles étudiées. La numérisation par densitométrie permet une évaluation plus précise sur HPTLC, car la mesure est hautement sensible (la lumière monochromatique de 190 à 800 nm peut être utilisée et réglée sur l'absorption/fluorescence maximales de chaque composé). L'analyse densitométrique est réalisée avant l'étape de dérivation. Seules les



substances ne contenant pas de groupements chromophores doivent être modifiées chimiquement pour les rendre détectables (Reich et Schibli, 2007).

Il y a deux principaux effets résultants de l'étape de pré-saturation des plaques TLC ou HPTLC. Le premier se traduit par une vitesse du front de solvant augmentée sur la plaque, mise dans une chambre de développement chromatographique pré-saturée par rapport à une autre développée dans une enceinte non pré-saturée. Le second correspond à une augmentation significative du volume de solvant de développement, adsorbé sur la surface du gel de silice de la plaque développée dans une enceinte non pré-saturée au niveau du front de migration (les composés séparés sont plus proches du front de migration). Dans la plupart des cas l'effet de pré-saturation sur la séparation chromatographique en cours est faible, mais peut être important pour des mélanges particuliers où de subtils changements dans la rétention des composés peuvent faire toute la différence (Scott, 2003). D'après Waksmundzka-Hajnos *et al.* (2008), l'analyse des monoterpènes par TLC nécessite l'utilisation de solvants apolaires (pentane, hexane). Les différentes classes de composés des huiles essentielles étudiées (FP et DP) sont visibles sur les deux types de plaques développées, grâce à l'utilisation d'un réactif pour la révélation qui est le 4-Methoxybenzaldéhyde ou 4-Anisaldéhyde (dit aussi *p*-Anisaldéhyde, Aldéhyde Anisique ou encore Aldéhyde Anise). La détection ou révélation en TLC est généralement basée sur la coloration naturelle, la fluorescence, l'absorption en UV ou l'usage de divers types de réactifs pour la révélation (sélectifs ou non) (Sherma, 1998). Le réactif 4-Anisaldéhyde est considéré comme étant le réactif de révélation qui donne les meilleurs résultats dans le cas de l'analyse des huiles essentielles par TLC, car permet une meilleure ségrégation des nuances de couleurs d'un composé à l'autre (Pothier *et al.*, 2001). En présence de ce réactif, diverses réactions non quantitatives peuvent avoir lieu simultanément. Il a été postulé que des cations cyclopentényles se forment comme composés intermédiaires en se condensant avec le réactif 4-Anisaldéhyde et forment ainsi des produits colorés. Il est probable aussi que des colorants de type triphénylméthanes se forment avec les composés aromatiques (Hellmut, 1990). Ces réactions impliquant la coloration de certaines substances présentes dans le mélange à séparer sont plus ou moins des réactions bien définies, correspondants à la réaction d'une substance avec le réactif qui lui est adéquat. Globalement, il n'existe pas de réaction spécifique avec un réactif révélateur et le plus souvent plusieurs composés peuvent réagir avec le même réactif révélateur. Par contre, certaines réactions peuvent être exploitées de manière plus spécifique si on soupçonne la présence de certains groupements fonctionnels en particulier (Jork, 1994).

En plus du screening des terpénoïdes réalisés sur TLC et HPTLC pour les huiles essentielles de *P. scoparius*, ces techniques ont été également appliquées avec succès pour les molécules bioactives issues de l'Hibiscus (**Publication n°2**). Une plaque HPTLC a été utilisée dans ce cas, en se basant sur l'argument de Hahn-Deinstrop (2007) selon lequel des métabolites secondaires telles que les flavonoïdes montrent des bandes plus compactes et fortement séparées dans le cas d'un développement chromatographique sur HPTLC. Il est admis que l'usage de l'HPTLC est orienté de manière plus importante dans le cas de la quantification, alors que la TLC est destinée à des applications d'analyse qualitatives. Dans notre cas, l'usage de l'HPTLC est surtout motivé par une meilleure séparation. En effet, d'après Spangenberg *et al.* (2011) les temps de développement chromatographiques sont plus courts et la résolution est meilleure de 20% en HPTLC comparativement à la TLC.

La procédure appliquée est toujours la même (Figure 24), sauf qu'ici le système de développement (constitué d'un mélange d'acétate d'éthyle : eau : acide formique, 85 : 15 : 10, v/v/v) est différent car les molécules bioactives visées sont des polyphénols. En général, les systèmes de développement utilisés pour la séparation des polyphénols sur TLC ou HPTLC peuvent être constitués de 3, 4 ou 5 solvants de polarités différentes. Ainsi, la panoplie des solvants utilisés comprend les solvants apolaires ou de polarités très faibles (benzène, heptane, toluène), de moyennes polarités (chloroforme, acétate d'éthyle) et de polarités très fortes (méthanol, eau). En outre, les acides acétique et formique sont également employés pour s'affranchir de l'effet de l'ionisation des groupements acides et améliorer la forme des bandes chromatographiques (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008). Néanmoins, une pré-saturation de la chambre de développement chromatographique s'avère nécessaire dans ce cas. Une meilleure séparation des polyphénols a été constatée quand cette étape de pré-saturation de la chambre a été réalisée. La saturation de la chambre en vapeurs des différents solvants (constituant le système de développement chromatographique), semble être une étape importante dans le développement chromatographique qui suit.

La séparation chromatographique nécessite une révélation des composés séparés: la dérivation chimique. L'objectif primaire de la dérivation post-chromatographique est la détection des composés séparés par chromatographie pour une meilleure évaluation visuelle du chromatogramme. C'est une étape qui améliore la sélectivité et la sensibilité de détection. Elle peut s'effectuer selon trois modes : vaporisation (spray), trempage (dipping) et exposition aux vapeurs du réactif à utiliser (Haftmann, 2004). Dans le cas des antioxydants de *H. sabdariffa*, le réactif de révélation qui a été utilisé est l'acide 2-aminoéthylester diphenylborique ou

communément appelé NST. Ce réactif réagit surtout avec les flavonoïdes en donnant une coloration jaune-brunâtre fluorescente (Simonovska *et al.*, 2003). Ce réactif se fixe ainsi sur les composés phénoliques et différentes colorations prennent part dans la plaque chromatographiée. Pour assurer une meilleure fixation de ce réactif, le chauffage de la plaque est très important car la température permet aux réactions chimiques de révélation (dérivatisation) d'opérer plus rapidement ou d'opérer tout simplement (Hahn-Deinstrop, 2007). Ces différentes couleurs, pouvant expliquer différentes classes de composés, sont d'autant plus intenses que la concentration des composés correspondants est importante dans l'extrait. Certaines peuvent se manifester sous la lumière visible sans devoir à réaliser la dérivation post-chromatographique. C'est le cas des anthocyanines de l'Hibiscus qui donnent une coloration caractéristique allant du bleu au rouge-pourpre. Selon Wall (2007) certains composés sont suffisamment colorés (colorants naturels, synthétiques et nitrophénols) pour absorber dans le domaine du visible du spectre électromagnétique. Ils sont nettement détectables dans le visible et ne nécessitent pas de prétraitement (dérivatisation) pour leur visualisation. L'apparition des bandes correspondantes est fonction des extraits étudiés, les extraits les plus polaires (hydrométhanoliques) donnent une meilleure visualisation des bandes. La révélation par la lumière du visible (500 nm) et la lumière UV (366 nm) a permis de rendre compte de la richesse des extraits étudiés en polyphénols. A titre d'exemple, des composés qui s'apparentent à la quercétine, acide chlorogénique et rutine sont identifiables sur la plaque. Aussi, des bandes colorées apparentées aux anthocyanines ont été révélées par HPTLC. Elles sont d'ailleurs remarquablement distinguées des autres bandes de composés par leur coloration caractéristique sous la lumière blanche. Ces composés se localisent au bas de la plaque en raison de leur poids moléculaire élevé. Par faute de standards, ces composés n'ont pas été identifiés mais méritent une attention particulière en raison de leur potentiel antioxydant important. Facilement séparés et identifiés par TLC en raison de leur pigmentation naturelle (Forgacs et Cserhati, 2002), ces composés sont d'importance capitale pour les IAA. Longtemps utilisés comme colorants naturels, la tendance actuelle est plutôt orientée vers leur utilisation pour l'élaboration des suppléments alimentaires, la formulation d'aliments fonctionnels et des alicaments. Divers de leurs effets bénéfiques sur la santé relèvent de leur activité antioxydante (Kong *et al.*, 2003).

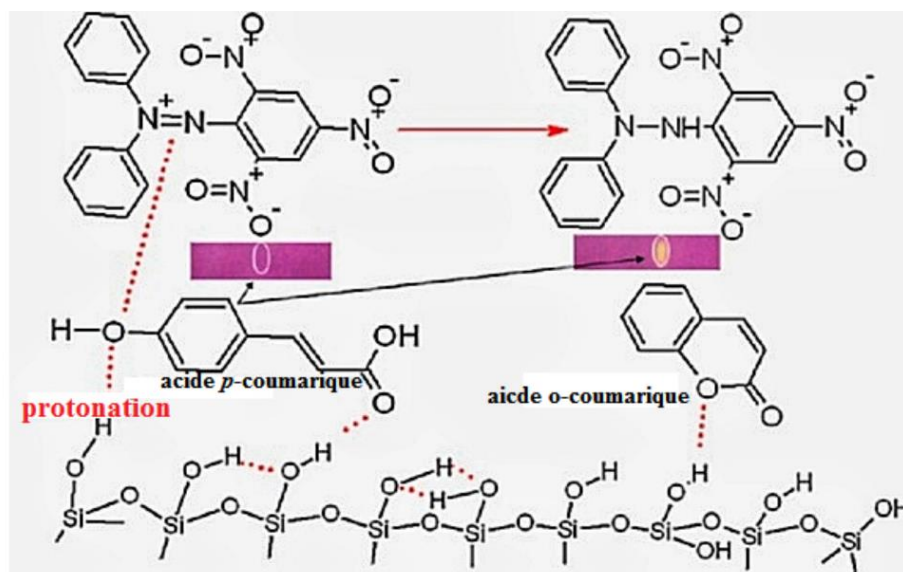
Puisque la plaque utilisée contient un élément fluorescent en UV dans la phase stationnaire (F<sub>254</sub>), plusieurs composés ont pu être décelés à 366 nm qui ne sont pas visibles avec la lumière blanche. Les substances incolores susceptibles d'être excités pour produire une fluorescence ou phosphorescence par rayonnement UV (366 nm) peuvent être irradiées sous lampe UV. La

radiation visible émise (au-dessus de 400 nm) peut être perçue comme des zones de couleurs rouge, jaune, orange, verte, bleue ou violette contre un fond noir de la plaque. Quant aux substances incolores et non luminescentes ayant une absorption propre dans la région des ondes courte en UV, elles peuvent être visualisées sous lampe UV à 254 nm grâce à l'indicateur fluorescent de la plaque (Sherma et Fried, 2003).

En parallèle avec la séparation chromatographique des molécules bioactives des huiles essentielles de *P. scoparius* et les extraits d'*H. sabdariffa*, une investigation de leur activité antioxydante sur TLC (*P. scoparius*) (**Publication n°1**) et HPTLC (*H. sabdariffa*) (**Publication n°2**) a été entreprise.

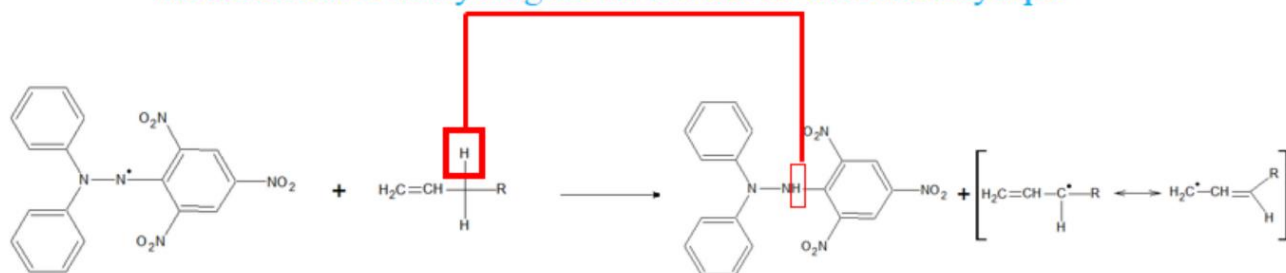
Une multitude de méthodes *in vitro* et *in vivo* sont utilisées à l'heure actuelle pour la détermination de la capacité scavenging (piégeage) des radicaux libres par les extraits de plantes ainsi que leurs antioxydants isolés. Le screening *in vitro* est l'outil sélectif principal pour la recherche des antioxydants, qui montrent potentiellement une activité scavenging à l'encontre des radicaux libres (Wozniak *et al.*, 2010). Parmi les radicaux les plus communément étudiés on cite le DPPH•. Ce radical forme une coloration pourpre en solution, qui se transforme en une coloration jaune pâle en présence d'un radical libre piégeur (scavenger) (Blois, 1958). Ce radical libre stable accepte un électron ou un hydrogène pour devenir une molécule diamagnétique stable (Kroyer, 2004). L'évaluation de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH• a été longtemps réalisée par spectrophotométrie. Cependant, un des inconvénients majeurs des tests spectrophotométriques se traduit par la mesure de l'activité antiradicalaire globale de l'extrait, sans pour autant identifier les composés potentiellement piégeurs des radicaux libres (Kedare et Singh, 2011). Le test TLC-DPPH• ainsi que la procédure détaillée de sa mise en œuvre ont été rapportés pour la première fois par Glavind et Holmer (1967). Dans ce test, la plaque TLC ou HPTLC développée au préalable et séchée est vaporisée ou trempée dans une solution méthanolique de DPPH•. Les composés à activité antiradicalaire (ou scavenging) apparaissent sous forme de spots jaunâtres sur un fond rose-pourpre. La plupart des travaux effectués sur TLC-DPPH• se sont focalisés sur les polyphénols (Simonovska *et al.*, 2003 ; Yrjönen *et al.*, 2003 ; Pozharitskaya *et al.*, 2007a ; Pozharitskaya *et al.*, 2007b; Ciesla *et al.*, 2012 ; Olech *et al.*, 2012). Concernant l'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées, le développement de la plaque TLC a été réalisé selon la même procédure détaillée précédemment. Des bandes intenses et lumineuses ont été observées. Le screening des fractions actives par TLC-DPPH• a montré des bandes lumineuses bien localisées sur la plaque, pouvant

signifier que seuls certains composés des huiles essentielles étudiées ont une propriété scavenging vis-à-vis du radical DPPH. Les deux fractions les plus actives sur la plaque (situées approximativement au milieu de la plaque) montrent des intensités différentes, en fonction de la longueur d'onde de la lumière à laquelle sont exposées. Exposées à la lumière ultra-violette ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ), la bande identifiée en (FP) est plus intense par rapport à la bande en (DP) (**Figure 1b, Publication n°1**). Cette intensité importante pour FP est probablement due à la teneur élevée en monoterpènes aromatiques (11,3%) (**Tableau 2, Publication n°1**). Il est généralement admis que pour les composés organiques les bases d'acide nucléiques absorbent fortement le rayonnement UV, mais aussi les molécules qui possédant des doubles liaisons, des noyaux aromatiques, des acides aminés aromatiques et des ponts disulfures (rencontrés dans les vitamines, les cofacteurs et les pigments) dans leurs structures chimiques de base (Beaulieu, 2007). Dans le cas de la lumière blanche, la fraction la plus active ayant réagi fortement avec le DPPH• est celle de (DP). Cette bande a d'ailleurs gardé le même aspect (bande arrondie sur les bords sous forme d'un arc) après exposition à la lumière UV et la lumière visible. On remarque également une certaine luminescence au niveau de la base du chromatogramme de (FP), signifiant probablement que certains terpènes n'ont pas migré sur la plaque et pouvant posséder une activité scavenging. En plus de ce qui a été discuté précédemment (**Publication n°1**), différents arguments ont été avancés en faveur de l'activité antioxydante de certains monoterpènes. Il est démontré que les monoterpènes oxygénés (thymol et carvacrol) possèdent une forte activité antioxydante, liée à la présence d'un groupement hydroxyle dans leurs structures à l'instar des polyphénols. Les monoterpènes hydrocarbonés tels que le  $\gamma$ -terpinène possèdent également une activité antioxydante comparable à celle des polyphénols, inféodée à la présence de doubles liaisons en positions 1 et 4 de l'anneau aromatique. Ce terpène peut facilement céder des atomes d'hydrogène au niveau des positions 3 et 6, grâce à la présence des doubles liaisons précédentes. Ainsi, deux hypothèses ont été formulées pour expliquer son activité scavenging: *i*) le radical  $\gamma$ -terpinényle peut stopper la propagation des radicaux libres par liaison ou bien *ii*) peut jouer le rôle d'un antioxydant secondaire en neutralisant l'oxygène singulet ou triplet présents dans le milieu (Öztürk, 2012). Dans le même sens, Foti et Ingold (2003) ont démontré que le  $\gamma$ -terpinène présent dans les huiles essentielles retarde la peroxydation de l'acide linoléique, conduisant à la formation de *p*-cymène comme unique produit organique dans la réaction en chaîne initiée par le radical hydroperoxyde HOO•. La peroxydation de l'acide linoléique est couramment connue pour être une réaction en chaîne,



**A**

arrachement d'un hydrogène au niveau du carbone allylique



**B**

**Figure 33** : représentation schématique de l'interaction entre polyphénols (acides *p*- et *o*-coumariques) et sites actifs du gel de silice dans le test TLC-DPPH• (A) et mécanisme réactionnel proposé entre le DPPH• et les monoterpènes à doubles liaisons conjuguées (B) (Ciesla *et al.*, 2012 ; Wojtunik *et al.*, 2014).

initiiée par les radicaux linoléylpéroxydes  $\text{LOO}^\bullet$  dont les produits sont des hydroperoxydes de linoléyle. Cette retardation rapide de la peroxydation de l'acide linoléique est due à la terminaison rapide de la chaîne de peroxydation, suite à une réaction croisée très rapide entre les radicaux  $\text{HOO}^\bullet$  et  $\text{LOO}^\bullet$ . Là aussi, l'activité antioxydante du  $\gamma$ -terpinène a été comparable à celle d'un composé phénolique. L'activité scavenging a été également rapportée pour des monoterpènes tels que :  $\alpha$ -terpinène, citronellal, citral, terpinolène et géraniol dont les activités sont nettement supérieures à l'activité antiradicalaire du Trolox (antioxydant synthétique et équivalent hydrophile de l' $\alpha$ -tocophérol). Le géraniol, le terpinolène et le  $\gamma$ -terpinène des huiles essentielles du genre *Citrus* étudiées ont montrées des activités scavenging assez élevées contre le radical DPPH (Choi *et al.*, 2000). L'activité antiradicalaire de ces monoterpènes est attribuée à la présence des doubles liaisons (liaisons  $\pi$ ). La réaction du DPPH $^\bullet$  avec le système de doubles liaisons conjuguées (localisées dans la structure des monoterpènes) conduit à la formation d'une structure stabilisée par résonance (Figure 33B). Cette stabilisation est associée avec une délocalisation de la charge sur toute la molécule, probablement en raison de la présence des doubles liaisons conjuguées ( $\pi$ ). Le blocage de ces doubles liaisons semble avoir un effet néfaste sur l'activité scavenging des monoterpènes (Wojtunik *et al.*, 2014). Les monoterpènes ne sont pas les seuls terpènes à avoir cette action antioxydante, d'autres terpènes ont été étudiés pour leurs propriétés scavenging. Les diterpènes phénoliques du romarin (*Rosmarinus officinalis*) ont montré une activité antioxydante dans des systèmes hydrophiles et lipophiles. La présence d'un groupement catéchol au niveau de l'anneau aromatique de ces composés ( $\text{C}_{11}$  -  $\text{C}_{12}$ ) est probablement l'élément structural clé à l'origine de l'activité antioxydante de ces composés (del Baño *et al.*, 2003). Les diterpènes abiétanes isolés à partir de l'extrait des racines d'une espèce endémique en Algérie (*Salvia barrelieri* Ettling) ont montré une forte activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH $^\bullet$  (Kabouche *et al.*, 2007).

L'application de la méthode HPTLC-DPPH $^\bullet$  sur les différents extraits obtenus par extractions assistées par microondes et ultrasons (**Publication n°2**) a montré que les fractions les plus actives sont surtout visibles dans le cas des extraits hydro- méthanoliques et acétoniques. Les fractions apparentées à l'acide chlorogénique montrent une forte activité scavenging, probablement due à son interaction avec le support et le DPPH $^\bullet$  par un mécanisme similaire à celui présenté en Figure 33A. Les extraits méthanoliques montrent d'autres fractions actives apparentées aux anthocyanines précédemment visualisées par HPTLC. L'intensité de la lumière émise par ces fractions est fonction de leur potentiel scavenging radicalaire. Cette activité antioxydante dans le cas des polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanines) est

due à la présence de groupements hydroxyles, dont le nombre et la position influencent significativement leurs propriétés scavenging des radicaux libres. Ces groupements hydroxyles interagissent avec les sites actifs de l'adsorbant (gel de silice dans ce cas), formant principalement des liaisons hydrogènes (Poole, 2015). L'usage d'un solvant de développement plus approprié permettra une meilleure séparation des différentes classes de ces antioxydants. Les bandes situées à la base de la plaque HPTLC montrent également une certaine activité scavenging, ce qui laisse à croire que certains composés qui n'ont pas migrés peuvent posséder une activité antioxydante importante. Ceci nous pousse à dire qu'une méthode chromatographique plus appropriée doit être développée pour une meilleure séparation des composés, à travers un choix plus pertinent du système de développement.

A travers ces techniques, on peut conclure que la chromatographie planaire (TLC/HPTLC) a permis un screening performant des antioxydants des plantes étudiées. Une caractérisation qualitative de l'activité antioxydante sur plaque constitue une des preuves incontestables du potentiel antioxydant des différents antioxydants. Néanmoins, une caractérisation plus poussée dans ce qui suit fera appel aux techniques chromatographiques avancées.

## **2.2. MHE-GC-MS**

La chromatographie gazeuse est une technique analytique de référence qui étaye la recherche, le développement et le contrôle de qualité dans plusieurs industries. Elle a évolué avec tant de rapidité pendant les deux décennies qui ont suivies son invention en 1952, d'où le progrès de sa pratique actuelle tient d'ailleurs ses racines (Bartle et Meyers, 2002).

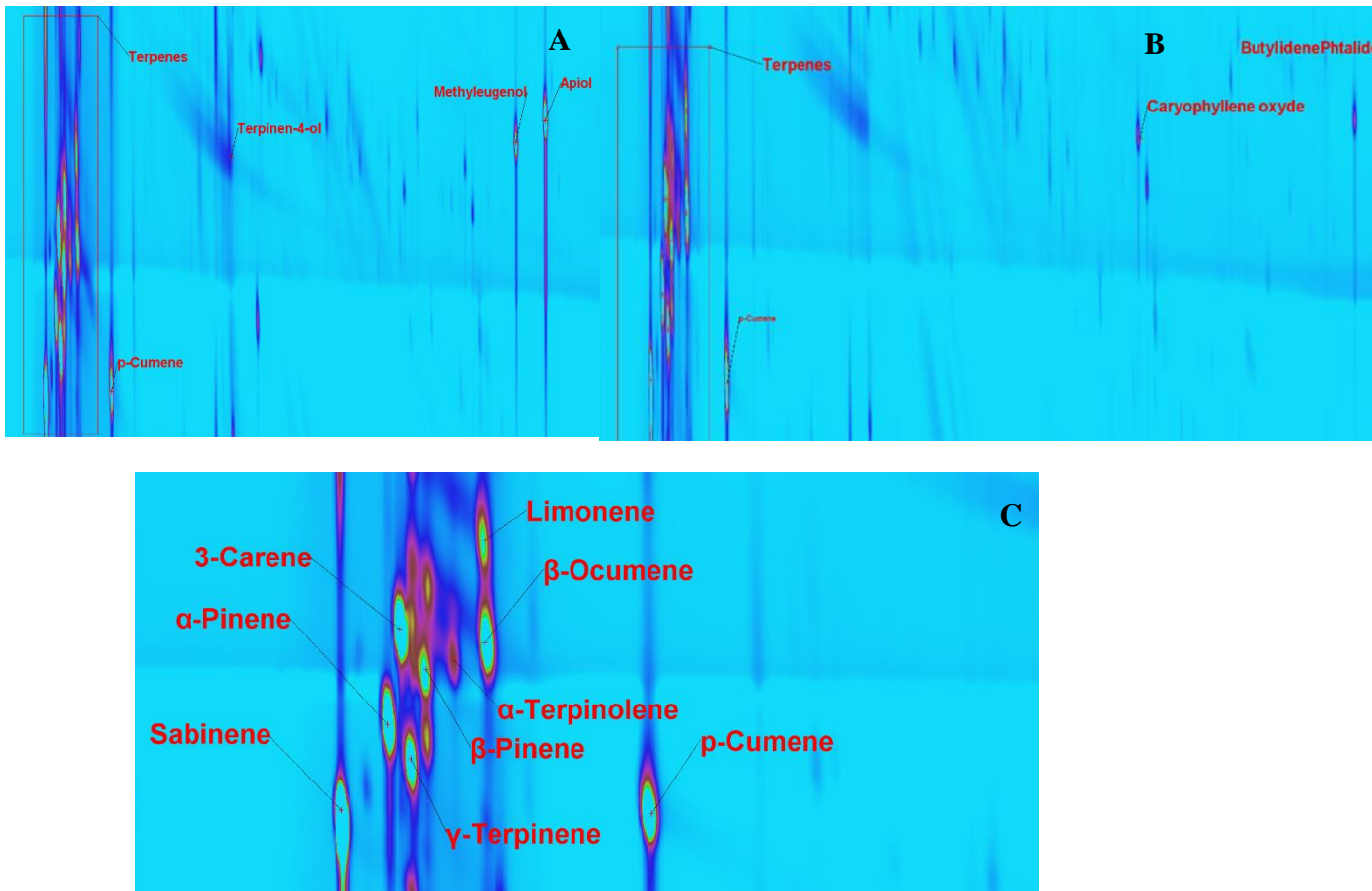
L'identification de la composition des huiles essentielles de *P. scoparius* a fait l'objet d'une première tentative d'identification des différents groupes de terpènes, par une extraction préalable des composés volatils par la technique d'extraction multiple en espace de tête statique ou multiple headspace extraction (MHE). Une analyse par GC-MS a succédé cette dernière pour identification des groupes de composés. L'un des avantages de MHE est la possibilité d'effectuer l'analyse sans pour autant réaliser un étalonnage préalable du système chromatographique (Merabtine, 2010), en plus d'être considérée parmi les plus simples techniques d'extraction en phase gazeuse en termes d'instrumentation (Kloskowski *et al.*, 2007). Le chromatogramme obtenu (**Figure 3, Publication n°1**) montre une diversité importante dans la composition en terpènes des huiles essentielles, par identification d'une multitude de pics chromatographiques (110 au total) et confortant sensiblement les résultats déjà obtenus par TLC. Les monoterpènes occupent une partie importante du chromatogramme,



avec plus de 50 pics du global de pics identifiés et la moitié de ces pics représente la majorité des composés volatils. Le groupe des terpènes oxygénés constitue le second groupe majoritaire du chromatogramme. Ce groupe est constitué de terpènes alcools et de quelques composés aromatiques (des phénylpropanoïdes vraisemblablement). Le dernier groupe étant les diterpènes, faiblement représenté sur le chromatogramme et constituant une proportion mineure par rapport à la totalité des pics identifiés. Les résultats de la quantification des composés volatils à partir de MHE sont rapportés dans le Tableau 1 (**Publication n°1**). Les teneurs en composés volatils ont été calculées à partir de trois échantillons de *P. scoparius* pour chaque groupe identifié. La teneur en volatils totaux dans les trois groupes identifiés a été de 0,284% pour l'échantillon 1, 0,399% pour l'échantillon 2 et 0,203% pour l'échantillon 3. Les meilleurs coefficients de corrélation sont obtenus pour l'échantillon 3 et ce pour les trois groupes identifiés :  $R^2 = 0,9969$  (monoterpènes),  $R^2 = 0,9999$  (diterpènes) et  $R^2 = 0,9989$  (terpènes oxygénés). Ainsi, une bonne linéarité a été obtenue pour la méthode chromatographique appliquée sur les trois échantillons de *P. scoparius* analysés. Enfin, la quantification et l'identification directes des composés volatils sont possibles dans ce cas à partir d'échantillons frais de *P. scoparius* sans aucun traitement préalable. La précision et la sensibilité peuvent être maximisées lors de l'utilisation de la technique headspace en mode statique couplée à la chromatographie gazeuse, par la sélection des conditions optimales pour l'analyse (Penton, 1992).

### **2.3. GCxGC**

La seconde tentative de caractérisation fine des huiles essentielles a été de faire appel à une chromatographie gazeuse bidimensionnelle plus performante : la GCxGC. La chromatographie gazeuse à deux dimensions ou bidimensionnelle (2D/GCxGC) est la technique avancée la plus informative pour l'analyse des mélanges complexes à plusieurs composés, de différentes classes de composés chimiques dont les polarités sont extrêmement différentes (Hantao *et al.*, 2014). De meilleurs résultats pour la séparation ne peuvent être obtenus que si un système de séparation adéquat (combinaison de colonnes) et un contrôle rigoureux des conditions de séparation sont assurés (Omais *et al.*, 2011). Pour obtenir une meilleure séparation en GCxGC, il est nécessaire d'utiliser des colonnes avec différentes sélectivités. Par conséquent, il est d'usage en GCxGC de recourir à une colonne contenant un liquide ionique hautement polaire (Seeley *et al.*, 2008).



**Figure 34 :** chromatogrammes GCXGC des huiles essentielles de *P. scoparius*. (A) huile essentielle des fleurs (EsOF), (B) huile essentielle des tiges (EsOS), (C) un zoom sur la partie terpènes dans la partie gauche du chromatogramme (a) et (b). Les zones rectangulaires en rouge représentent les terpènes des huiles essentielles.

La technique GCxGC a été appliquée dans notre cas sur les EsO de *P. scoparius* issues des tiges (**Figure 4 ; Publication n°1**) et des tiges (EsOS) et fleurs (EsOF) de la plante (**Figure 34 ; manuscrit soumis pour publication**). Pour les besoins de la séparation dans les deux cas, des liquides ioniques de type pyridinium ont été utilisés après développement de ceux-ci pour usage en GCxGC (Shashkov et Sidelnikov, 2013). Cette classe de phases stationnaires a montré une grande polarité et sélectivité pour les composés oxygénés. Le système de colonnes GCxGC utilisé est constitué d'une première colonne contenant un liquide ionique de type pyridinium dicationique (4MPyC6) et d'une seconde colonne contenant du siloxane non polaire (HP-5). Une sélection appropriée des conditions de séparation, adaptées pour la séparation des terpènes de *P. scoparius* a conduit à une séparation et amélioration excellentes de la résolution. Les chromatogrammes 2D obtenus pour les huiles essentielles étudiées ont montré deux aspects : *i*) apparition de différentes zones sur les chromatogrammes signifiant différentes classes des composés identifiés et *ii*) les chromatogrammes 2D ont mis en exergue les différences entre les huiles essentielles étudiées. De suite, trois groupes principaux ont été dégagés : 1) le groupe des composés à bas points d'ébullition (monoterpènes), 2) le groupe des composés les plus polaires (carbonyles, alcools) et 3) le groupe des composés les moins polaires (sesquiterpènes, acides à longues chaînes et esters aromatiques et terpéniques) (Figure 34). Ces trois groupes ont été observés dans les trois huiles essentielles étudiées et les différences entre ont été discutées. Cette distribution des groupes corrobore parfaitement avec les résultats qualitatifs et quantitatifs de la MHE-GC-MS et les résultats qualitatifs de la TLC. Un chromatogramme 2D a une structure typique: les spots des composés sont divisés en groupes dans un certain ordre, facilitant énormément leur identification. Sachant la disposition des groupes pour une combinaison de colonnes donnée, il est possible d'interpréter le chromatogramme par simple examen visuel (Patrushev, 2015).

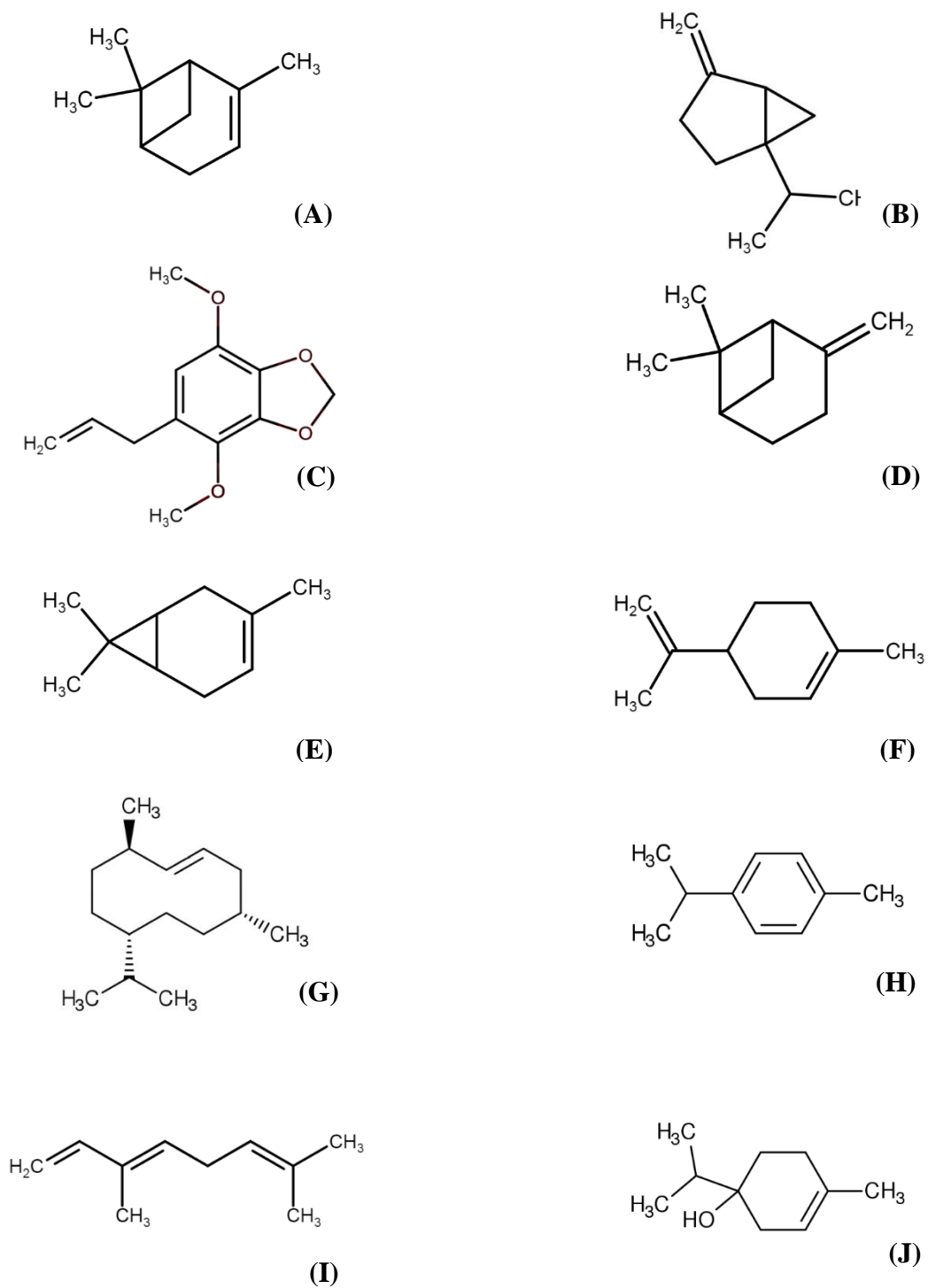
Des études antérieures ont montré l'intérêt que revêt la GCxGC dont les travaux de Di *et al.* (2004) qui ont étudié le couplage des techniques : micro-extraction en phase solide combinée au headspace reliée à la chromatographie gazeuse 2D (HS-SPME-GCxGC), afin de dresser les chémotypes des huiles essentielles et des composés volatils à partir de matières végétales de composition complexe. Il en est ressorti que de tels couplages permettent une authentification et un contrôle qualité des matières végétales, par l'obtention de chromatogrammes 2D caractéristiques servant d'empreinte digitale analytique pour l'échantillon analysé. Dans la même optique, différents couplages avec la GCxGC ont été réalisés afin de rendre compte des chémotypes des EsO à composition complexe et permettre une meilleure séparation et

identification des composés. Plusieurs conditions opératoires ont été testées, dont le but final est d'aboutir à une empreinte chromatographique pour chaque huile essentielle analysée. La supériorité de l'analyse GC 2D par rapport à la GC 1D a été argumentée. Les approches bien que différentes dans leur instrumentation, reposent toutefois sur les données initiales de la GC 1D pour mettre en place le dispositif expérimental final. Le couplage avec la spectrométrie de masse dans plusieurs de ces études a rendu la caractérisation des composés encore plus puissante. Néanmoins, ces techniques semblent donner à elles seules des informations fragmentaires. La complémentarité des informations obtenues à chaque fois permet de se faire une image de la complexité de l'analyse des mélanges de produits naturels telles que les EsO (Dimandja *et al.*, 2000 ; Shellie *et al.*, 2002 ; De Godoy *et al.*, 2011 ; Omar *et al.*, 2012 ; Filippi *et al.*, 2013 ; Cordero *et al.*, 2015 ; Krupčik *et al.*, 2015 ; Krupčik *et al.*, 2016 ; Zoccali *et al.*, 2017).

#### **2.4. GC-MS**

La chromatographie gazeuse a démontré sans aucun doute sa supériorité quant à l'analyse quantitative, grâce à son haut pouvoir de résolution et l'utilisation des méthodes de détection universelles (détection à ionisation de flamme ou FID) pour la séparation d'un mélange de composés volatils (Merfort, 2002). Les huiles EsO ont pris particulièrement avantage des avancées fulgurantes de la GC-MS, en termes de séparation et de détection et nombreux sont les chercheurs qui se sont tournés vers la spectrométrie de masse (MS) pour l'identification des pics (comparaison des spectres enregistrés avec ceux des spectrothèques MS) (Oprean *et al.*, 1998 ; Mariott *et al.*, 2001).

La GC-MS dans la présente étude a permis la quantification et l'identification d'un bon nombre de composés dans les EsO étudiées. A partir des huiles essentielles issues de la plante fraîche (FP) et la plante sèche (DP), 48 composés ont été identifiés par CG-MS. Les données quantitatives ont été calculées en se basant sur le rendement moyen des huiles essentielles qui est de  $0,50 \pm 0,09\%$  (m/m). Les monoterpènes constituent le groupe le plus abondant des composés identifiés. Ceci est appuyé par les résultats précédents des techniques MHE-GC-FID-MS et GCxGC. Les principaux constituants appartiennent principalement à la classe des monoterpènes hydrocarbonés: sabinène,  $\alpha$ -pinène, p-cymène,  $\alpha$ -thujène et  $\beta$ -pinène, mais aussi des monoterpènes oxygénés comme le terpinène-4-ol et le spathulénol. D'autres composants tels que: les sesquiterpène hydrocarbonés, les sesquiterpènes oxygénés et les dérivés aromatiques de monoterpènes ont également été détectés (**Tableau 2, Publication n° 1**).



**Figure 35 :** structures chimiques des composés majoritaires des huiles essentielles de la partie aérienne de *P. scoparius* caractérisés par GC-MS:  $\alpha$ -pinène (A), sabinène (B), apiol (C),  $\beta$ -pinène (D), carène (E), limonène (F), germacrène (G), p-cymène (H),  $\beta$ -ocimène (I) and terpinèn-4-ol (J).

D'autre part, la composition des EsO à partir des fleurs (EsOF) et des tiges (EsOS) de *P. scoparius* a été rapportée (**Tableau 1, manuscrit soumis pour publication**). Des composés terpéniques aux nombres de 44 et 37 ont été détectés par GC-MS dans EsOF et EsOS respectivement. Ces composés peuvent être classés en cinq groupes distincts: *i*) monoterpènes hydrocarbonés, *ii*) monoterpènes oxygénés, *iii*) monoterpènes aromatiques, *iv*) sesquiterpènes hydrocarbonés et *v*) sesquiterpènes oxygénés. Certains de ces composés sont communs pour les deux EsO, d'autres au contraire sont spécifiques pour chacune d'elles. Le groupe principal est représenté par les monoterpènes hydrocarbonés dont les composés majoritaires (Figure 35) sont :  $\alpha$ -pinène, sabinène,  $\beta$ -pinène, 3-carène, *p*-cymène, limonène et  $\alpha$ -phellandrène. Les monoterpènes oxygénés sont représentés par les composés suivants : terpinène-4-ol, *cis*- $\beta$ -terpinéol, (-)-spathuléol, *cis*-verbénol et *cis*-sabinol. Les deux composés germacrène et  $\beta$ -eudésmol sont des sesquiterpènes également détectés dans les deux EsO. Des différences qualitatives et quantitatives sont constatées dans la composition de ces dernières ( $p < 0,05$ ). En effet,  $\alpha$ -pinène, sabinène,  $\beta$ -pinène et 3-carène ont des teneurs plus élevées dans EsOS, tandis que germacrène, limonène, terpinéol, *cis*- $\beta$ -phellandrène et  $\beta$ -eudesmol sont nettement plus concentrés dans EsOF. L'apiol est un composé majoritaire dans EsOF, qui n'a pas été identifié dans EsOS. L'hétérogénéité des deux chémotypes est évidente pour le restant des composés.

D'après les résultats obtenus dans les deux cas, la concentration en terpènes peut varier soit en fonction de l'état frais ou séché de la plante ou encore en fonction de l'organe à partir duquel l'EsO a été extraite. Ceci a une incidence directe sur l'activité antioxydante (comme discuté précédemment) et peut donc expliquer certaines constatations soulevés en TLC/HPTLC. De ces résultats, il en découle que la GC-MS est de surcroît la technique idéale pour l'étude de la composition des EsO de *P. scoparius*. En général, la GC-MS permet une identification fiable des composés dans les huiles essentielles à composition complexe. Pour cette raison, il existe des spectrothèques commerciales contenant non seulement les spectres de masse des substances les plus ciblées, mais aussi des informations concernant les indices de rétention sur les colonnes apolaires. Pour des raisons de commodité, les séparations sont effectuées sur des colonnes apolaires.

Une étude très récente sur les EsO de *P. scoparius* a souligné leur grande variabilité chimique. La variabilité au sein de la population et la variation au cours des stades de développements de la plante semblent être limités. Deux grandes conclusions ont été tirées : *i*) la diversité des chémotypes identifiés traduit la diversité des EsO de *P. scoparius* en Algérie et *ii*) ces différences dans les chémotypes sont probablement liées à des différences génétiques qu'à des

conditions environnementales (pédoclimatiques par exemple) (Malti *et al.*, 2018). La technique GC-MS permet en effet de générer des empreintes digitales chromatographiques pour les EsO, pouvant être utiles pour les besoins de classification. L'exemple typique est celui de la différenciation des échantillons de même type mais d'origines géographiques différentes (Wang *et al.*, 2014). La GC-MS a été souvent qualifiée de technologie 2D à elle seule dont le pouvoir de séparation de la colonne GC dépend de la capacité du pic et de la sélectivité (Phillips et Xu, 1995).

En plus de l'analyse des huiles essentielles, la GC-MS a été utilisée pour l'analyse des acides gras dans les huiles végétales étudiées (PO, SBO et SFO) afin de caractériser le profil en acides gras de chaque huile. Les teneurs en acides gras individuels des huiles végétales (PO, SFO et SBO) sont rapportés (**Tableau S1, manuscrit soumis pour publication**). Les acides gras ont été détectés par CG-MS sur une colonne contenant un liquide ionique type pyridinium comme phase stationnaire, afin d'aboutir à une séparation entre les isomères *cis* et *trans*. Les acides gras caractérisés ont des nombres d'atomes de carbone allant de 12 à 22. Aucune teneur en acides gras en dessous de 12 ou au-dessus de 22 atomes de carbone n'a été détectée. Les acides gras saturés sont représentés par les acides laurique (C12:0), myristique (C14:0), palmitique (C16:0), margarique (C17:0), stéarique (C18:0), arachidique (C20:0) et béhénique (C22:0). Les acides gras non saturés sont principalement les acides oléique (C18:1), linoléique (C18:2) et linoléinique (C18:3). On constate que les profils en acides gras sont assez hétérogènes et des différences significatives existent entre les huiles étudiées ( $p < 0,05$ ). L'acide palmitique est l'acide gras dominant dans l'huile de palme (PO) (50,30%). Les acides gras saturés ont une teneur en acides gras saturés plus élevée que celle des acides gras insaturés, l'acide oléique (38,1%) étant l'acide gras insaturé majoritaire. Cependant, les acides gras insaturés dans l'huile de soja (SBO) sont prédominants. Les acides linoléique (60,6%) et oléique (18,3%) sont nettement prédominants que l'acide palmitique (10,8%). L'huile de tournesol (SFO) a montré une dominance marquée des acides gras insaturés correspondant aux acides linoléique (64,7%) et linoléinique (18,2%) par rapport aux acides gras saturés dont l'acide stéarique (9,1%). Les teneurs rapportées sont en accord avec les teneurs de ces huiles végétales documentées dans la littérature scientifique (Gunstone, 2007 ; O'Brien, 2008). De manière générale, les acides gras varient en fonction de la provenance de l'huile végétale et donc de la sélection variétale mais aussi des conditions d'extraction. Certaines huiles doivent impérativement avoir un certain seuil pour un certain type d'acides gras. Par exemple, le Codex Alimentarius stipule que l'huile de

**Tableau 3** : composition en triglycérides (TAG) des huiles végétales étudiées (SFO, SBO et PO). TAG : triacylglycérols, SFO : huile de tournesol, SBO : huile de soja, PO : huile de palme. L : acide linoléique, O: acide oléique, P : acide palmitique, S : acide stéarique, Li : acide linoléique.

TAG (%)	SFO	SBO	PO
LLL	10.96 ± 0.03	14.97 ± 0.22	n.d.
OOP	7.25 ± 0.73 <sup>b</sup>	4.10 ± 0.11 <sup>c</sup>	13.87 ± 1.55 <sup>a</sup>
LOL	10.61 ± 0.99 <sup>a</sup>	9.95 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.16 ± 0.28 <sup>b</sup>
LOP	5.77 ± 0.52 <sup>c</sup>	6.36 ± 0.27 <sup>b,c</sup>	11.78 ± 1.35 <sup>a</sup>
OOL	11.57 ± 0.13	6.85 ± 0.32	n.d.
SOO	10.53 ± 0.46 <sup>a</sup>	3.19 ± 0.21 <sup>c</sup>	6.35 ± 0.92 <sup>b</sup>
OOO	23.55 ± 1.31 <sup>a</sup>	5.79 ± 0.60 <sup>c</sup>	8.72 ± 0.02 <sup>b</sup>
SOL	1.80 ± 0.32 <sup>c</sup>	5.93 ± 0.15 <sup>a</sup>	3.75 ± 0.85 <sup>b</sup>
LLP	5.38 ± 0.46 <sup>b</sup>	6.37 ± 1.21 <sup>a</sup>	6.16 ± 0.76 <sup>a</sup>
LLS	6.28 ± 0.75	7.72 ± 0.73	n.d.
PLP	1.42 ± 0.12 <sup>c</sup>	3.64 ± 0.44 <sup>b</sup>	10.75 ± 0.62 <sup>a</sup>
POP	1.02 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.98 ± 0.07 <sup>b</sup>	3.85 ± 0.45 <sup>a</sup>
LLLi	1.34 ± 0.07	9.55 ± 0.05	n.d.
POS	1.48 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.56 ± 0.08 <sup>b,c</sup>	8.37 ± 0.90 <sup>a</sup>
SSL	n.d.	2.08 ± 0.28	1.28 ± 0.20
LLiLi	n.d.	4.11 ± 0.07	n.d.
PPS	n.d.	n.d.	2.63 ± 0.74
PPP	n.d.	n.d.	6.15 ± 0.84
LLiS	n.d.	3.16 ± 0.26	n.d.
PLiP	n.d.	n.d.	1.23 ± 0.18
PLiLi	n.d.	0.27 ± 0.02	n.d.
LLiP	0.19 ± 0.02	n.d.	1.32 ± 0.40
LiLiLi	n.d.	0.92 ± 0.12	n.d.
SOS	0.87 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.31 ± 0.69 <sup>a</sup>
SSP	n.d.	n.d.	0.88 ± 0.17
SSS	n.d.	n.d.	0.50 ± 0.09
StStSt	n.d.	n.d.	10.16
StUSt /StStU	4.79	10.04	27.79
StUU/UUSt	37.20	37.10	43.23
UUU	58.03	48.03	11.88
PND	0.00	4.83	6.94
	100	100	100

Les résultats sont présentés en moyennes ± SD de deux répétitions. Les moyennes n'ayant pas la même lettre en exposant dans chaque ligne sont significativement différentes ( $p < 0,05$ )



de tournesol doit contenir une teneur minimale de 60% pour l'acide linoléique (Merrien *et al.*, 2005).

## **2.5. HPLC**

La chromatographie liquide haute performance, anciennement appelée chromatographie liquide haute pression, a été développée à partir de la chromatographie liquide classique sur colonne. L'introduction de particules plus fines dans les matériaux de garnissage dans les années 1970s a généré une plus grande contre-pression, qui a nécessité à son tour une phase mobile à haute pression (Lundanes *et al.*, 2013). Dans la présente thèse, l'HPLC a été utilisé pour l'investigation de deux types de métabolites : triglycérides (métabolites primaires), composés phénoliques, tocophérols et phytostérols (métabolites secondaires). Le couplage HPLC-MS a permis la caractérisation de ces métabolites du point de vue quantitatif et qualitatif.

### **2.5.1. HPLC des triglycérides**

Le profil en triglycérides définit les caractéristiques physiques des corps gras. Les points de fusion des triacylglycérols sont particulièrement régis par la structure et la position des acides gras sur le glycérol. Ils affectent également le comportement de cristallisation des huiles végétales (Shahidi, 2005).

L'analyse de la composition en triglycérides (TAG) des huiles végétales (Tableau 3) montre un certain nombre de difficultés et limitations, en raison de la complexité structurale et la diversité de ces composés. Ces difficultés sont liées au fait qu'il n'est pas toujours évident d'aboutir à une séparation complète de tous les TAG. En outre, il y a des problèmes de détermination et de quantification des composés mineurs. L'identification de la composition triglycérique est effectuée sur la base de la masse molaire et l'ordre d'élution des composés correspondants. Dans ce cas précis, la problématique du positionnement de l'acide gras sur le squelette de base du glycérol est posée (positions 1 ou 2 sur le glycérol).

Les teneurs des différents TAG des huiles étudiées (PO, SFO et SBO) sont indiquées en Tableau 3. On peut remarquer que la composition triglycérique est très hétérogène d'une huile à l'autre. Globalement, quatre groupes de triglycérides sont identifiés: les trisaturés (StStSt), les disaturés (StStU), les monosaturés (StUU) et tri-insaturés (UUU). Un groupe de composés inconnus est révélé parmi les huiles de SBO et PO. L'huile de SFO a montré une teneur notable en TAG tri-insaturés (58,03%), incluant les LLL, OOL et LOL alors que les TAG monosaturés représentent le second groupe (37,20%) comprenant SOO, LOP et POO. Les disaturés constituent la teneur

la plus faible parmi les groupes (4,79%), alors qu'aucune teneur pour les TAG trisaturés n'a été rapportée. L'huile SBO présente une composition similaire que celle de SFO, avec une forte teneur en tri-insaturés (48,03%) dont les TAG LLL, LLLi, LOL, OOL et OOO. Les monosaturés constitue le deuxième groupe le plus important (37,10%) représenté par LOP, LLP et LLS. Les disaturés (10,03%) forment le groupe le moins abondant. Les trisaturés n'ont pas été détectés et une faible teneur en TAG non identifiés a été détectée (4,83%). Dans PO, les monosaturés constituent le groupe le plus abondant (43,23%) et les espèces triglycériques représentatives de ce groupe sont : POO, LOP, SOO et LLP. Les TAG disaturés sont le deuxième groupe le plus important (27,79%) dont les principaux sont: PLP, POP et POS. Les tri-insaturés (11,88%) et les saturés (10,16%) représentent les groupes les moins abondants. Les trisaturés tels que SSS (0,33%) sont moins abondants. Une faible teneur en composés non identifiés (6,94%) a été également détectée.

Les teneurs en TAG dans les huiles végétales étudiées sont en accord avec celles citées par O'Brien (2008), à l'exception des teneurs des disaturés dans l'huile de palme et les tri-insaturés dans l'huile de soja pour lesquels les teneurs sont relativement basses. Cela peut s'expliquer en partie par le pourcentage des TAG détectés mais non identifiés dans PO et SBO, respectivement de 6,94% et 4,83%. La composition des huiles végétales peut varier au sein des mêmes espèces botaniques pour plusieurs raisons : les conditions climatiques et agronomiques, la qualité du fruit ou de la graine, le système d'extraction de l'huile et le procédé de raffinage (Cert *et al.*, 2000).

### **2.5.2. HPLC des composés phénoliques**

Dans le cas des polyphénols, le profil phytochimique qualitatif et quantitatif de l'extrait aqueux concentré de *P. scoparius* a été investigué. Les résultats du couplage du système HPLC-DAD-ESI-MS sont montrés en Tableau 2 (**Publication n°3**). Différents constituants ont été séparés et identifiés, en présence de pics identifiés et non identifiés. L'acide 5-*O*-caféoylquinique (acide chlorogénique) est de loin le composé majoritaire dans l'extrait, représentant la teneur la plus élevée (470,13 mg équivalents acide chlorogénique/100 g poids sec) ( $p < 0,05$ ). Les deux autres acides phénoliques : le 3-*O*-caféoylquinique et le 4-*O*-caféoylquinique sont les composés les moins abondants de l'extrait par rapport à l'acide chlorogénique ( $p < 0,05$ ). Les flavonoïdes sont également présents et sont représentés par la quercétine-3-*O*-rutinoside (rutine) et la quercétine-3-*O*-glucuronide (miquélianine). Leurs teneurs sont inférieures à celle de l'acide

chlorogénique de 6X ( $p < 0,05$ ). Un des composés dont le pic n'est pas identifié ( $m/z = 367$ ) peut être apparenté soit à un dérivé de l'un des acides cafféoylquiniques ou bien un de leurs isomères.

La présence de l'acide chlorogénique et de ses dérivés dans l'extrait analysé revêt une importance physiologique capitale. Ce composé phénolique soluble et majoritaire dans la pomme de terre, tomate et aubergine (Niggeweg *et al.*, 2004) est considéré comme étant un antioxydant au sein même des plantes (Daniels *et al.*, 1963 ; Daniels et Martin, 1967 ; Leatham *et al.*, 1980 ; Tamagone *et al.*, 1998). Etant un acide phénolique à biodisponibilité élevée, il revêt une importance capitale malgré sa marginalisation par rapport aux autres polyphénols alimentaires. Le potentiel antioxydant de cet acide est probablement plus accessible que celui des flavonoïdes. Ceci peut s'expliquer en partie par sa propriété scavenging du radical superoxyde, mais aussi des radicaux peroxy générés lors du processus d'oxydation des lipides. Cet acide est soit directement absorbé dans le petit intestin (Kono *et al.*, 1997 ; Plumb *et al.*, 1999 ; Williamson *et al.*, 2000 ; Nardini *et al.*, 2002 ; Niggeweg *et al.*, 2004 ; Sato *et al.*, 2011), ou dégradé en acides caféique et quinique dans le gros intestin par les estérases de la microflore intestinale. La libération de l'acide caféique s'accompagne d'une absorption relativement rapide. Il a la caractéristique d'avoir une stabilité métabolique lors de son absorption (Couteau *et al.*, 2001 ; Scalbert *et al.*, 2002 ; Niggeweg *et al.*, 2004) semblable à la capacité antioxydante à l'acide chlorogénique (Rice-Evans *et al.*, 1997). A côté des acides phénoliques, les flavonoïdes sont d'excellents piègeurs (scavengers) des radicaux libres. La rutine (quercétine-3-*O*-rutinoside) a montré une activité scavenging de 33X plus grande que son homologue structural isoquercétine (Sawa *et al.*, 1999). L'acide chlorogénique et la rutine ont montré des activités remarquablement plus élevées que celles du L-cystéine (8X), du glutathion réduit (17X) et de l'acide ascorbique (33X) (Akaike *et al.*, 1995 ; Sawa *et al.*, 1999). Il a été également rapporté que les flavonoïdes rutine et miquélianine (quercétine-3-*O*-glucuronide) sont des chélateurs puissants. Ils neutralisent avec efficacité les processus d'oxydation initiés par les métaux de transition et agissent comme des antioxydants briseurs de chaîne et régénérateurs de l' $\alpha$ -tocophérol (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Rice-Evans *et al.*, 1997). La présence de la fraction *ortho*-dihydroxyphényle dans leur structure semble jouer un rôle primordial dans l'activité antioxydante (Miura *et al.*, 2002).

**Tableau 4 :** teneurs en tocophérols et phytostérols des huiles végétales étudiées (SFO, SBO et PO). SFO : huile de tournesol, SBO : huile de soja, PO : huile de palme.

Compounds	SFO	SBO	PO
<b>Tocophérols</b>			
δ-Tocophérol	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.57 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.00 <sup>b</sup>
β-Tocophérol	4.80 ± 0.08 <sup>b</sup>	8.46 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>c</sup>
γ-Tocophérol	4.57 ± 0.00 <sup>b</sup>	5.70 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.00 <sup>c</sup>
α-Tocophérol	251.79 ± 4.26 <sup>a</sup>	201.76 ± 6.16 <sup>b</sup>	18.92 ± 0.46 <sup>c</sup>
Total	261.16	216.49	20.58
<b>Phytostérols</b>			
Campestérol	105.36 ± 0.75 <sup>a</sup>	81.20 ± 2.28 <sup>b</sup>	12.65 ± 0.15 <sup>c</sup>
clerostérol	14.88 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
Stigmastérol	88.80 ± 0.00 <sup>a</sup>	79.49 ± 0.82 <sup>b</sup>	5.42 ± 0.05 <sup>c</sup>
5.Xi.-Ergost-7-ène, 3β	18.00 ± 1.37 <sup>b</sup>	28.36 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
β-Sitostérol	1115.52 ± 1.51 <sup>a</sup>	737.50 ± 38.72 <sup>b</sup>	53.49 ± 0.97 <sup>c</sup>
α-amyrine	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
delta5 avenastérol	25.51 ± 1.22 <sup>a</sup>	17.34 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
delta7 sitostérol	86.91 ± 1.82 <sup>a</sup>	85.23 ± 0.88 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
cycloeucalénol	33.65 ± 0.70 <sup>b</sup>	47.04 ± 3.60 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
delta7 avenastérol	42.33 ± 0.88 <sup>b</sup>	65.52 ± 0.67 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
24-	46.40 ± 0.97 <sup>a</sup>	41.39 ± 0.74 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
Methylenecycloartanol			
citrostadiénol	57.05 ± 1.19 <sup>b</sup>	66.90 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>
Total	1634.42	1249.96	71.56

Les résultats sont présentés en moyennes ± SD de deux répétitions. Les moyennes n'ayant pas la même lettre en exposant dans chaque ligne sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

### **2.5.3. HPLC des tocophérols et des phytostérols**

La teneur en tocophérols des huiles végétales (SFO, SBO et PO) sont montrées en Tableau 4. Quatre tocophérols ont été identifiés et quantifiés :  $\delta$ -tocophérol,  $\beta$ -tocophérol,  $\gamma$ -tocophérol et  $\alpha$ -tocophérol. Les teneurs en ces tocophérols varient dans les huiles de différentes manières. La teneur en tocophérols totaux varie de 20,58 ppm à 261,16 ppm pour PO et SFO, respectivement. PO étant moins riche en tocophérols totaux que SFO ( $p < 0,05$ ). L' $\alpha$ -tocophérol est le principal tocophérol présent dans les huiles, dont la valeur la plus élevée a été obtenue pour SFO (251,79 ppm) alors que la teneur la plus faible a été obtenue pour le PO (18,92 ppm). D'une part, des teneurs plus élevées en  $\beta$ -tocophérol ont été obtenues pour SBO (8,46 ppm) et en SFO (4,80 ppm). En revanche, le  $\gamma$ -tocophérol présente des teneurs plus élevées en SBO (5,70 ppm). Le  $\delta$ -tocophérol est le tocophérol le moins abondant parmi tous les tocophérols détectés. Aucune teneur en ce tocophérol n'a été obtenue dans le cas du SFO ( $p < 0,05$ ). Ces teneurs restent bien évidemment faibles, étant donné que les huiles analysées sont raffinées.

La présence de l' $\alpha$ -tocophérol et de ses trois isomères dans les huiles est d'un intérêt majeur en technologie des corps gras, étant donné leur activité antioxydante et leur capacité à induire une certaine stabilité oxydative dans les corps gras. L' $\alpha$ -tocophérol est un antioxydant de type briseur de chaîne des réactions radicalaires (Barclay et Ingold, 1980), lutte contre la peroxydation lipidique des membranes cellulaires et peut arrêter la chaîne radicalaire en formant un dérivé de faible réactivité (radical tocophéroxyde) incapable d'attaquer les substrats lipidiques (Descamps-Latscha *et al.*, 2001). Il est stipulé que l' $\alpha$ -tocophérol dénote une plus grande activité antioxydante que le  $\gamma$ -tocophérol à des concentrations inférieures. Aussi, l' $\alpha$ -tocophérol a la capacité de céder un hydrogène plus facilement comparé aux autres isomères, car son oxydation est plus rapide durant le processus d'oxydation des lipides (Seppanen *et al.*, 2010). Dans les réactions radicalaires, les tocophérols sont connus pour piéger la propagation des radicaux peroxydes par au moins deux mécanismes: (i) céder un hydrogène aux radicaux peroxydes pour produire des hydroperoxydes et (ii) formation d'adduits à partir du radical tocophéroxyde résultant et un second radical peroxyde. Il a été stipulé que les deux tocophérols ( $\alpha$ -et  $\gamma$ -tocophérols) réagissent avec les radicaux peroxydes selon les deux mécanismes évoqués (Lampi *et al.*, 1999), mais l' $\alpha$ -tocophérol réagit de manière plus intense que le  $\gamma$ -tocophérol (Yanishlieva *et al.*, 2002). L'activité antioxydante des tocophérols diminue à des concentrations élevées suite à : (i) leur participation dans une réaction secondaire (décomposition des hydroperoxydes) pour générer des radicaux alkoxy et (ii) la participation de leurs radicaux tocophéroxydes dans un certain nombre de réactions de peroxydation (Yamauchi *et al.*, 1995).

De plus, le processus de raffinage des huiles végétales abaisse de manière drastique la teneur en ces antioxydants, notamment durant l'étape de désodorisation. Leur teneur très faible dans le produit final peut être un indicateur d'une instabilité oxydative (O'Brien, 2008).

Les teneurs en phytostérols sont également indiquées en Tableau 4. Un total de 12 composés ont été quantifiés et identifiés: campestérol, clerostérol, stigmastérol, 5.Xi-ergost-7-ène, 3 $\beta$ ,  $\beta$ -sitostérol,  $\alpha$ -amyrine,  $\Delta$ 5-avenastérol,  $\Delta$ 7-sitostérol, cycloeucalénol,  $\Delta$ 7-avenastérol, 24-méthylèncycloartanol et citrostadiénol. La teneur totale en phytostérols a varié de 71,56 ppm (PO) à 1634,42 ppm (SFO). Le  $\beta$ -sitostérol est le phytostérol dominant avec des teneurs variant de 53,49 ppm (PO) à 1115,52 ppm (SFO). Les phytostérols restants montrent des teneurs inférieures, le campestérol (105,36 ppm) montrant la teneur la plus élevée dans le SFO. L' $\alpha$ -amyrine est pratiquement absent dans les échantillons étudiés. Ces substances phytochimiques bioactives sont dotées de propriétés antioxydantes et permettent également la réduction du taux de cholestérol dans le sang (Hassanien *et al.*, 2014). À partir des données obtenues dans le Tableau 7, il est clairement démontré l'apparition de plusieurs classes de phytostérols et leurs teneurs sont plus élevées par rapport à celles des tocophérols. Toutefois, la teneur en phytostérols totaux obtenus pour les différentes huiles étudiées n'est pas en accord avec celles signalées par Phillips *et al.* (2002), variant de 2100-2970 ppm (SBO), 580-930 ppm (PO) et 2700-3520 ppm (SFO). Ces valeurs sont bien plus élevées que celles rapportées dans la présente étude. En général, la faible teneur en stérols végétaux peut s'expliquer par le procédé de raffinage qui conduit à abaisser sensiblement les teneurs en phytostérols au cours de l'étape de désodorisation. D'autres facteurs interviennent aussi : la saison de croissance et la variété botanique de l'huile végétale. Ces substances rentrent dans plusieurs formulations en tant qu'ingrédients fonctionnels dans les aliments, offrant une option pratique et sûre pour la réduction du cholestérol dans le sang (Quilez *et al.*, 2003). Leur analyse dans les huiles végétales permet la détection des fraudes quant à leurs origines (Aluyor *et al.*, 2009).

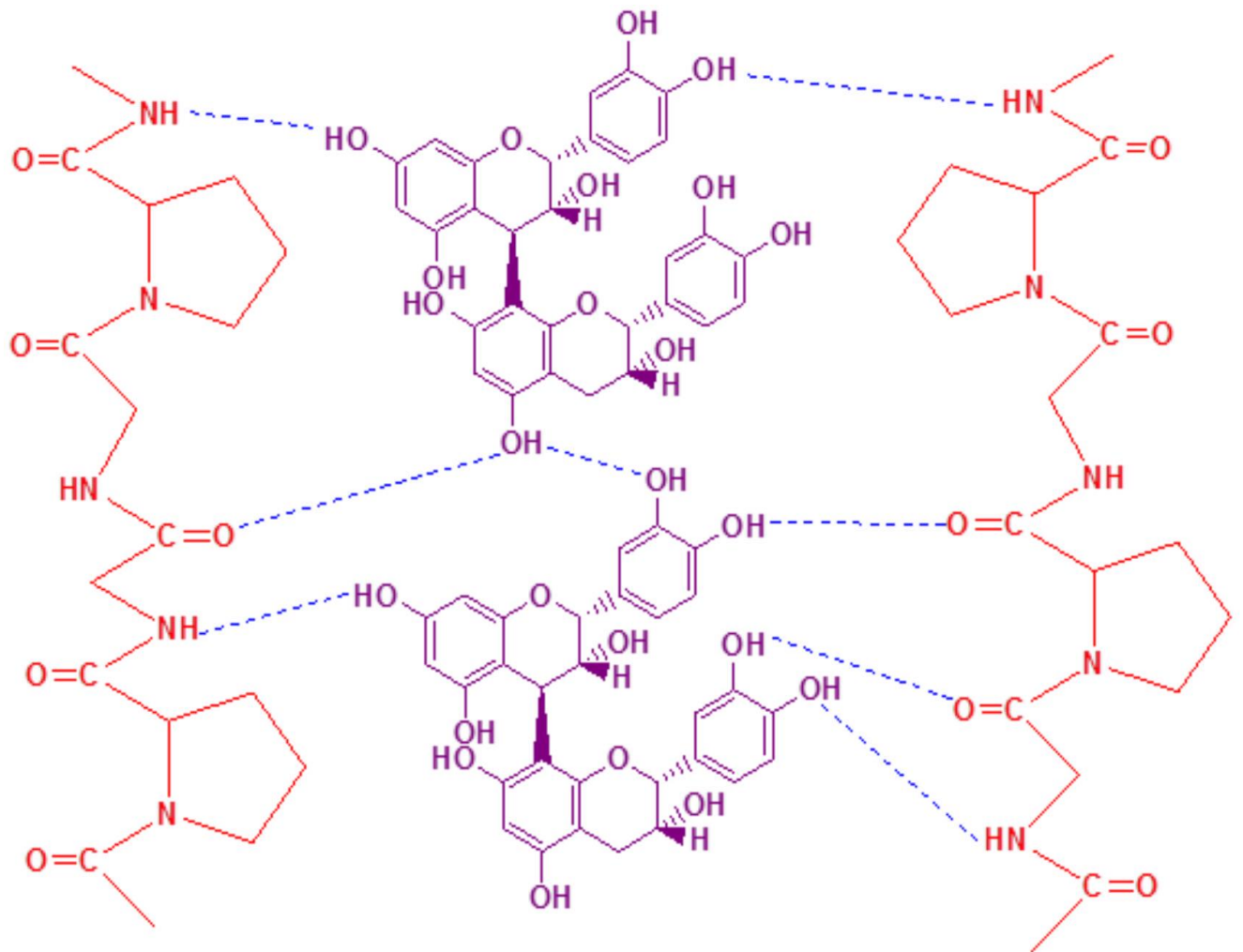
### **3. Contribution de l'électrophorèse et de la chromatographie dans l'étude des interactions protéine-polyphénols**

Les polyphénols peuvent interagir avec des macromolécules (protéines ou polysaccharides) de manière réversible et irréversible. Lorsque la complexation est réversible, les forces non covalentes (liaison hydrogène, liaison hydrophobe, forces de van der Waals) sont les plus impliquées. L'interaction irréversible s'effectue par la formation de liaisons covalentes entre la macromolécule et le polyphénol. La réactivité des polyphénols peut s'expliquer par des

facteurs liés à leurs structures, y compris la forme, la projection des groupes hydroxyles, la présence de groupes galloyles et la position des groupes périphériques imposés par la stéréochimie des anneaux pyranes (Le Bourvellec et Renard, 2012). Les liaisons covalentes et non covalentes sont susceptibles d'être contractées, démontré par exemple dans le cas de la liaison de l'acide chlorogénique aux protéines (Prigent *et al.*, 2003 ; Prigent *et al.*, 2007).

La présente partie de la thèse s'intéresse au devenir des polyphénols issus des extraits bruts de *P. scoparius* et *H. sabdariffa* une fois incorporés dans les émulsions à base de lactosérum. L'extrait brut queux de *P. scoparius* a été incorporé dans une émulsion à base de lactosérum élaborée à l'échelle laboratoire (**Publication n°3**) alors que les extraits aqueux et hydroacétoniques bruts d'*H. sabdariffa* ont été incorporés dans une émulsion à base de lactosérum à l'échelle pilote (**Publication n°2**). L'étude des interactions pouvant avoir lieu entre les polyphénols issus de ces plantes et certains composés des émulsions a été réalisée sur la phase aqueuse de chaque émulsion. Du point de vue chronologique, l'étude des interactions protéine-polyphénols a débuté avec la phase aqueuse récupérée de l'émulsion incorporée de l'extrait aqueux de *P. scoparius*, où un dimère a été observé lors de l'analyse électrophorétique. Dans ce sens, les résultats obtenus sur cet extrait seront présentés en premier lieu, ensuite seront présentés les résultats sur les phases aqueuses récupérées à partir des émulsions contenant les extraits d'*H. sabdariffa*.

L'extrait de *P. scoparius* montre en effet des interactions avec les protéines du lactosérum, se traduisant par la formation d'un dimère caractéristique (**Figure 1, Publication n°3**), qui est confirmé dans sa nature par analyse densitométrique (**Figure 2, Publication n°3**). Comme discuté dans la publication, les protéines majoritaires du lactosérum liquide utilisé semblent être impliquées dans ces interactions. Particulièrement, la  $\beta$ -Lactoglobuline ( $\beta$ -LG) a joué un rôle important dans ces interactions, en se liant de manière covalente aux polyphénols présents dans l'extrait. Il est intéressant de noter que la force de ces liaisons covalentes a maintenu l'intégrité du complexe (dimère) même dans les conditions dénaturantes de la Tricine SDS-PAGE (présence de SDS et 2-Mercaptoéthanol). Il en ressort de cette étude que les polyphénols contenus dans l'extrait aqueux incorporé dans l'émulsion interagissent de toute évidence avec les protéines de la phase aqueuse. L'impact de ces interactions dans l'émulsion a été étudié uniquement du point de vue de sa stabilité oxydative (ceci sera discuté dans la partie stabilité oxydative). Ces interactions ont été bel et bien confirmées dans l'étude des interactions entre les polyphénols d'*H. sabdariffa* et les protéines du lactosérum (**Publication n°2**). La formation



**Figure 36 :** schéma des interactions entre les tanins condensés et les protéines (adapté de de Freitas et Mateus, 2012).



de complexes (dimères) a été confirmée par Tricine SDS-PAGE (**Figure 4, Publication n°2**), avec les phases aqueuses contenant les extraits aqueux et hydroacétoniques. En plus de l'implication de la  $\beta$ -LG dans les interactions, les caséines semblent aussi prendre part dans la formation de ces complexes. D'après les résultats de l'analyse LC-ESI-MS/MS réalisée sur les bandes des dimères (bandes 1, 2 et 3) (**Tableau 2, Publication n°2**), différentes caséines sont impliquées dans cette association avec les polyphénols dont : caséine  $\alpha$ -S1, caséine  $\alpha$ -S2 et caséine  $\beta$ . La  $\beta$ -LG n'est identifiée que dans la bande 1 (37 kDa) et ce sont plutôt les caséines qui sont impliquées dans la formation des dimères dans les bandes 2 et 3. Celles-ci proviennent du lactosérum brut, récupéré après l'étape d'égouttage du fromage. Il est donc assez fréquent de rencontrer des caséines sensées être dans le lait de départ dans le lactosérum. Ces résultats confortent ainsi la pertinence de l'utilisation de la LC-ESI-MS/MS comme outil puissant, pour une investigation exhaustive des protéines impliquées dans la formation de ces complexes. D'autres investigations sont nécessaires pour élucider la nature exacte du polyphénol impliqué ainsi que le type de liaisons mises en œuvre.

Du fait que les polyphénols font partie intégrale de notre alimentation quotidienne, il est naturel qu'ils interagissent avec les composés de l'aliment notamment les macromolécules comme les protéines. Les polyphénols ont une affinité à se lier avec divers types de protéines dont les protéines salivaires, les enzymes digestives, les protéines plasmatiques, les protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives et bien d'autres. Ceci engendre des changements structuraux au niveau des protéines, la formation d'agrégats complexes qui dépendent de la taille et de la nature de celles-ci (Gonçalves *et al.*, 2007 ; de Freitas et Mateus, 2013 ; Ulrich, 2017). L'affinité importante des caséines a été démontrée dans des études précédentes, grâce à la présence d'un nombre élevé en acides aminés type proline. Ceci se traduit par l'établissement de liaisons de type hydrogène entre le groupement carbonyle au niveau de l'acide aminé, peptide ou protéine et le groupement hydroxyle du polyphénol. D'autres interactions entre les noyaux aromatiques des polyphénols et les résidus d'acides aminés hydrophobes sont possibles (Hofmann *et al.*, 2006 ; Pascal *et al.*, 2008). En Figure 36 sont montrées les interactions hydrogènes et hydrophobes entre les noyaux phénoliques et les chaînes latérales apolaires des acides aminés tels que la proline. Certains polyphénols ont une affinité plus forte avec les protéines contenant un grand nombre de charges positives et négatives, tandis que d'autres peuvent se lier fortement à des protéines contenant un nombre relativement plus élevé en résidus proline (Nagy *et al.*, 2012). La structure cyclique de la proline peut faciliter une conformation plus ouverte et plus souple des protéines, ce qui permet la

réaction entre les protéines de grande taille riches en proline avec les polyphénols (Williamson, 1994). Les protéines qui sont fortement enroulées de manière globulaire ont probablement des affinités beaucoup plus basses pour les polyphénols. La proline est également unique dans sa capacité à former des liaisons peptidiques *cis*, très rigides lors de la formation des complexes protéine-polyphénols (Luck *et al.*, 1994).

Des études de docking moléculaire sur les interactions entre les polyphénols et différentes protéines ( $\beta$ -LG,  $\alpha$ -caséine et  $\beta$ -caséine) ont mis la lumière sur la nature et les mécanismes intervenants. Plusieurs liaisons hydrogènes s'établissent entre ces polyphénols et les différents résidus d'acides aminés qui stabilisent le complexe  $\beta$ -LG-polyphénols. De manière similaire, les caséines forment des adduits avec les polyphénols et différents acides aminés sont impliqués dans la stabilisation des adduits formés. Un système de liaisons hydrogènes se met également en place entre les polyphénols et les résidus d'acides aminés pour stabiliser les adduits des caséines  $\alpha$  et  $\beta$ . L'affinité de la liaison des polyphénols avec ces différentes protéines est exprimée dans l'ordre : caséine  $\beta$  > caséine  $\alpha$  >  $\beta$ -LG. La liaison formée avec les polyphénols altère la structure secondaire des protéines et augmentation de feuillets  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$  pour la  $\beta$ -LG, avec réduction des structures en hélice  $\alpha$  et feuillets  $\beta$  dans les caséines  $\alpha$  et  $\beta$  menant à une déstabilisation structurelle partielle de la protéine (Hasni *et al.*, 2011 ; Kanakis *et al.*, 2011 ; Chaphai *et al.*, 2018). Les molécules de caséine  $\beta$  peuvent envelopper les catéchines menant à une structure plus rigide et serrée (Jöbstl *et al.*, 2006).

Dans d'autres études sur les polyphénols du vin, les anthocyanines purifiées (à partir de la peau du raisin) et hydrophiles (dans l'ordre de polarité : délphinidine > cyanidine > pétunidine > péonidine > malvidine) sont plus adsorbés sur les lies de levures (constituées surtout de protéines). Cette relation entre la polarité des anthocyanines et leur adsorption par les protéines des levures a été bien démontrée ultérieurement. En outre, les composés acétylés sont moins éliminés par les cellules (les protéines de surface membranaires) des levures fraîches (Medina *et al.*, 2005 ; Le Bourvellec et Renard, 2012). D'autres études contredisent ces observations. L'adsorption des anthocyanines par les membranes cellulaires des levures pendant la fermentation alcoolique du moût, ou pendant la production de vin rouge, fait intervenir plutôt des dérivés acyles des anthocyanines (acétyle et dérivés de *p*-coumaryles). Les dérivés les plus hydrophobes sont plus fortement retenus que les dérivés non acylés. En outre, les anthocyanines ayant un grand degré de méthylation sur l'anneau B (malvidine et péonidine) sont plus adsorbés que ceux plus hydroxylés (délphinidine et pétunidine) (Morata *et al.*, 2003 ; Mazauric et Salmon, 2005 ; Morata *et al.*, 2005 ; Mazauric et Salmon, 2006).

#### **4. Contribution du test Rancimat dans l'étude de la stabilité oxydative**

Les mécanismes réactionnels et les facteurs influençant les réactions d'oxydation sont différents entre les corps gras émulsifiés (émulsions) et les corps gras non émulsifiés (huiles végétales) (Hu et Jacobsen, 2016). La membrane interfaciale d'un système d'émulsion est d'importance capitale dans l'oxydation des lipides, car elle représente la région où lipides et composés hydrosolubles sont assez proches les uns avec les autres pour interagir, donnant lieu à des concentrations élevées en peroxydes et autres composés volatils (Berton *et al.*, 2011). L'ampleur de cette oxydation peut être mesurée par des méthodes chimiques et physiques, mais aussi via les tests de stabilité qui mesurent la stabilité d'un corps gras sous des conditions qui accélèrent le processus d'oxydation à l'état normal. Le Rancimat est un test qui permet d'évaluer la stabilité du corps gras en mesurant sa stabilité oxydative forcée à haute température et en présence d'un débit important d'oxygène (Sun *et al.*, 2011).

Les émulsions étudiées incorporées des extraits polyphénoliques d'*H. sabdariffa* et de *P. scoparius* ainsi que de l'huile essentielle de cette dernière, ont fait l'objet d'une étude de leur résistance contre l'oxydation forcée par le test Rancimat. Grosso modo, les résultats indiquent que l'incorporation des différents extraits a eu un effet protecteur contre l'oxydation (**Publication n°1 ; Tableau 3, Publication n°2 ; Tableau 3, Publication n°3**), à l'exception près de l'extrait hydroacétonique brut d'Hibiscus obtenu par ultrasons (USAC80) (**Tableau 3, Publication n°2**) dont le temps d'induction ne diffère pas significativement de celui de l'émulsion témoin ( $p < 0,05$ ). Ceci témoigne de l'effet positif de ces extraits polyphénolique ou terpénique ayant montré une activité antioxydante (résultats TLC/HPTLC-DPPH<sup>•</sup>), résultat de la présence de différents composés bioactifs caractérisés précédemment par chromatographie. Il est toutefois à noter que les résultats des périodes d'induction changent en fonction des émulsions élaborées (échelles laboratoire et pilote) et ce pour les mêmes conditions opératoires. Les résultats obtenus montrent aussi que les interactions rapportées précédemment n'ont pas affecté la stabilité oxydative des émulsions. Les dimères formés n'ont pas diminué l'activité antioxydante des polyphénols impliqués dans leur formation.

Plusieurs études se sont intéressées de près à l'activité antioxydante des extraits de plantes et de leurs composés phénoliques dans les huiles végétales. Celles-ci ont été surtout étudiées dans des conditions pouvant favoriser leur oxydation (températures de 120 °C), afin d'évaluer la performance des composés phénoliques additionnés (Aladedunye *et al.*, 2017). Diverses

**Tableau 5** : points de fusion des échantillons étudiés. PO : huile de palme, Mix : mélange des huiles végétales de tournesol, soja et palme. EsOF : huile essentielle des fleurs de *P. scoparius*, EsOS : huile essentielle des tiges de *P. scoparius*.

Echantillon	Point de fusion (°C)
PO wo and with EsOF and EsOS	
PO	34,2 ± 0,4 <sup>a</sup>
PO + 5% EsOF	33,8 ± 0,3 <sup>a</sup>
PO + 5% EsOS	34,4 ± 0,3 <sup>a</sup>
Mix wo and with EsOF and EsOS	
Mix	22,6 ± 0,3 <sup>a</sup>
Mix + 5% EsOF	22,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
Mix + 5% EsOS	22,6 ± 0,2 <sup>a</sup>

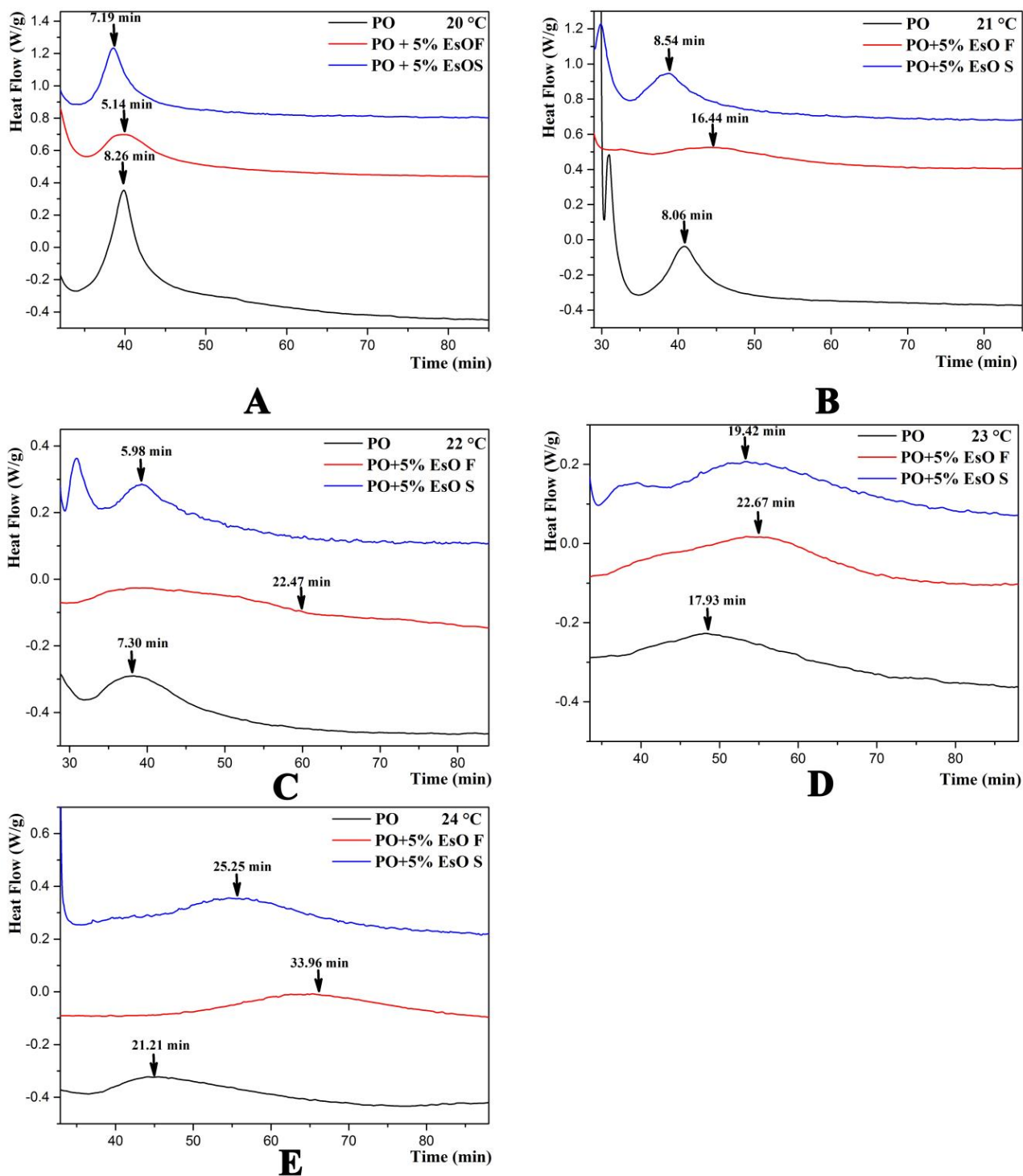
Les résultats sont présentés en moyennes ± SD de trois répétitions. Les moyennes ayant la même lettre en exposant dans la colonne ne sont pas significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

plantes et épices ont démontré leur efficacité à retarder le développement de la rancidité des huiles végétales et des AG même dans les conditions de peroxydation lipidique *in vivo* (Ramarathnam *et al.*, 1995 ; Liégeois *et al.*, 2000 ; Kiokias *et al.*, 2008). En général, le problème rencontré lors de l'incorporation de ces extraits de plante est une odeur distincte, un goût ou une couleur qui compliquent leur utilisation systématique dans les aliments. La purification des extraits, combinée à un traitement ultérieur est habituellement nécessaire pour les convertir en additifs alimentaires appropriés (Tzia et Liadakis, 2003). En plus de leur activité antiradicalaire avérée, les flavonoïdes montrent une capacité de chélation des ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$ . Les groupements *ortho*-hydroxyyles sur l'anneau aromatique B, le groupement 3-hydroxyle combiné avec le groupement 4-carbonyle ou le groupement 5-hydroxyle combiné avec le groupement 4-carbonyle sont les sites de complexation des métaux (Brown *et al.*, 1998; Mira *et al.*, 2002; Engelmann *et al.*, 2005). Cependant, il a été montré que les flavonoïdes peuvent piéger de manière efficace les radicaux hydroxyyles et peroxyyles, mais qu'ils sont prooxydants avec  $\text{Cu}^{2+}$  (Cao *et al.*, 1997). L'activité antioxydante importante de la quercétine par rapport aux catéchines a été observée dans l'auto-oxydation de l'huile de coton (Tsimogiannis et Oreopoulou, 2004). La substitution du groupement *ortho*-hydroxyle de l'anneau B et la substitution complète des groupements 3-hydroxy 4-céto et de la double liaison 2,3 du cycle C entraînent une activité maximale des flavonoïdes, tandis que l'absence de l'un des éléments structuraux affecte l'activité antioxydante (Kiokias *et al.*, 2008). La quercétine est un flavonoïde très efficace dans l'inhibition de l'oxydation des lipides, dans différents systèmes d'émulsions huile-dans-eau (O/W) (contenant des huiles hautement insaturées), par rapport à d'autres antioxydants naturels puissants comme la catéchine, le  $\beta$ -carotène ou l' $\alpha$ -tocophérol (Di Mattia *et al.*, 2009 ; Huber *et al.*, 2009 ; Kiokias et Varzakas, 2014 ; Kiokias et Varzakas, 2017).

## **5. Contribution des techniques DSC, p-NMR et PLM dans l'étude de la cristallisation des lipides**

### **5.1. Point de fusion**

Le point de fusion d'une substance est une propriété physique clé, puisqu'il détermine l'adéquation et l'applicabilité d'un corps gras dans de nombreuses applications alimentaires. Un ensemble de facteurs peut influencer le point de fusion d'une substance organique tels que: le poids moléculaire, le nombre et la configuration des doubles liaisons, les ramifications, la stéréochimie et la présence d'un ou plusieurs groupements polaires (Knothe *et al.*, 2009). Les points de fusion évalués pour les échantillons étudiés sont présentés en Tableau 5.



**Figure 37** : courbes de cristallisation isothermes DSC de l'huile de palme avec et sans addition des huiles essentielles des fleurs et des tiges de *P. scoparius* à 20 (A), 21 (B), 22 (C), 23 (D) et 24°C (E). PO : huile de palme, EsOF : huile essentielle des fleurs de *P. scoparius*, EsOS : huile essentielle des tiges de *P. scoparius*. Heat flow : débit de chaleur.

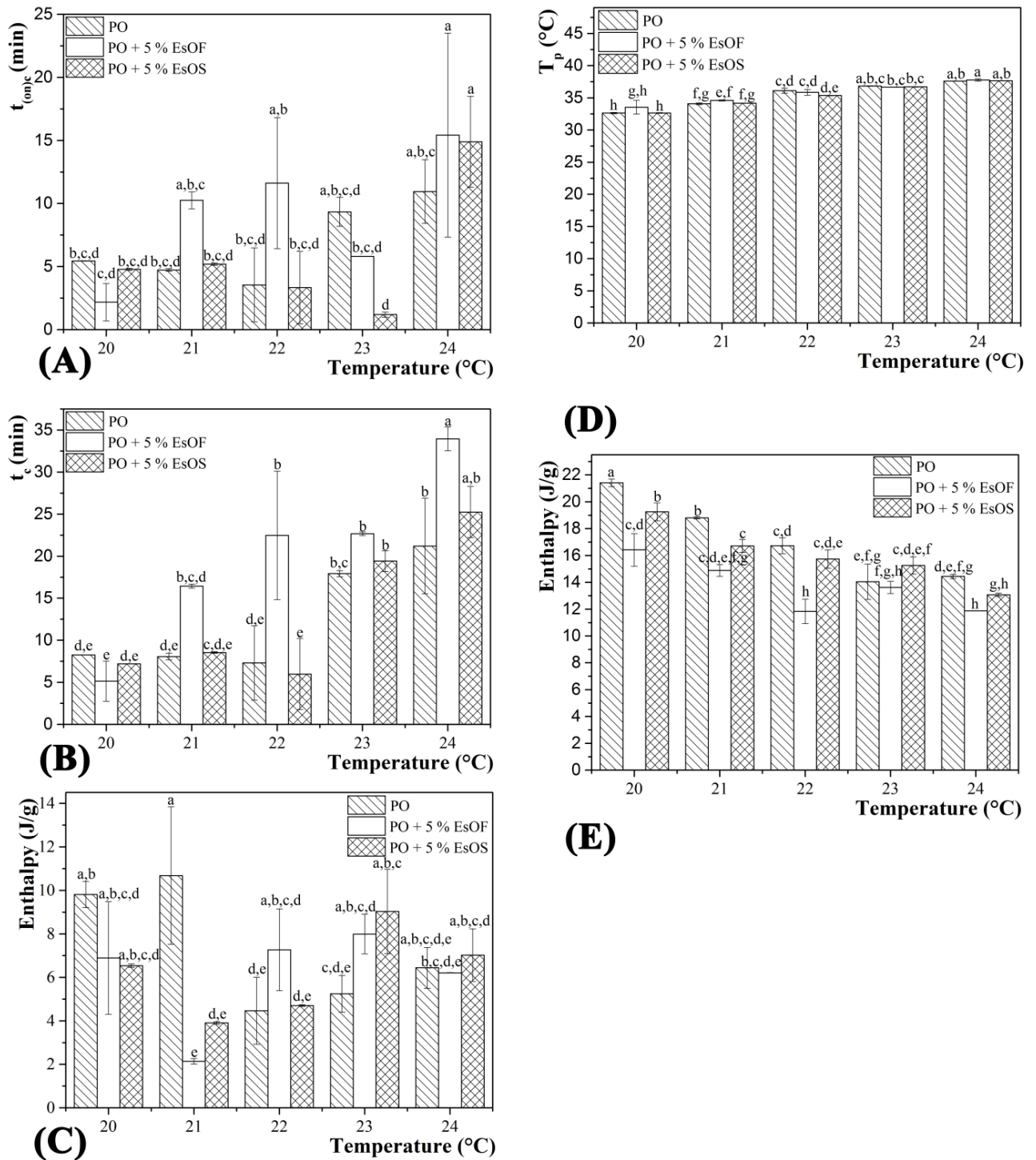
Les points de fusion de PO et Mix témoins et additionnés des huiles essentielles de *P. scoparius* (EsOF et EsOS) ont été évalués pour leurs points de fusion (Tableau 5). Le point de fusion de PO (34,2 °C) n'a montré aucune différence significative par rapport aux échantillons de PO additionnés des EsO ( $p > 0,05$ ), ce qui signifie que leur addition n'a pas affecté le point de fusion de PO. De même, le point de fusion des échantillons de Mix (22,6 °C) n'a pas changé avec l'addition des deux EsO précédentes ( $p > 0,05$ ).

## **5.2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)**

La DSC est un outil puissant pour étudier les phénomènes thermiques des composés alimentaires associés à des changements d'enthalpies. Elle peut être également utilisée pour étudier les changements thermiques dans des conditions dynamiques de température, ainsi que la collecte d'importantes données thermodynamiques et cinétiques (Biliaderis, 1983).

Dans les corps gras, la DSC est utilisée pour évaluer les transitions de phase telles que la cristallisation et la fusion. Dans les expériences de cristallisation en mode isotherme, des paramètres tels que le temps d'induction (début) de la cristallisation ( $t_{(on)c}$ ) et le temps de cristallisation de pic ( $t_c$ ) peuvent être calculés à partir de la DSC. Dans les conditions non isothermiques, les paramètres calculés sont la température de début de fusion ( $T_{on}$ ), la température de pic ( $T_p$ ), température de cristallisation ( $T_c$ ) et le changement d'enthalpie ( $\Delta H$ ) associé aux transitions de phase (fusion ou cristallisation). Cette terminologie va être suivie dans ce qui suivra.

La Figure 37 montre les profils DSC de cristallisation isothermes de PO cristallisé avec et sans addition de 5% des EsOF et EsOS de *P. scoparius*. Les Figures 38A-C montrent les paramètres évalués pendant le processus de cristallisation isotherme. A la température de cristallisation de 20 °C (Figure 37A), un exotherme est clairement identifié pour PO (PO témoin) dont le pic principal correspondant à un processus de cristallisation. L'addition des deux EsO a donné des profils similaires et n'a pas affecté le temps de début de cristallisation  $t_{(on)c}$  (Figure 38A,  $p > 0,05$ ). A mesure que la température de cristallisation augmente, le pics s'élargit et apparaît plus tardivement ( $t_{(on)c}$  plus élevé, Figure 38A). De plus, lorsque les échantillons ont été cristallisés à des températures de 21, 22 et 23 °C, un pic supplémentaire a été observé et formé avant le pic principal précédent. Ce pic n'a pas pu être intégré par le logiciel car au moment de son apparition, il a été détecté au tout début de l'étape isotherme rendant son intégration très délicate. De plus, ce premier pic a diminué en taille à mesure que la température augmente et a complètement disparu pour l'échantillon cristallisé à 24 °C (Figure 37E).



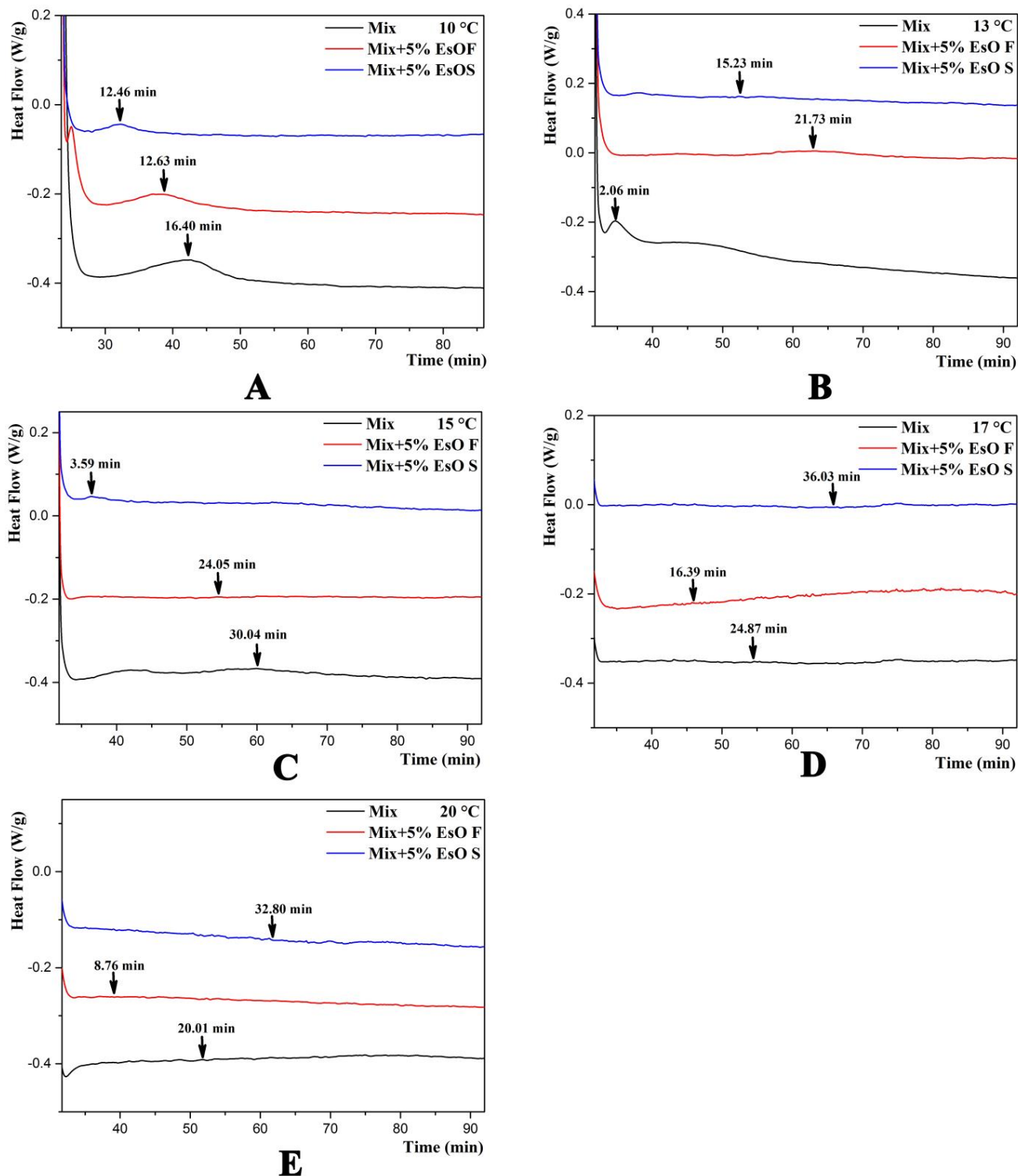
**Figure 38 :** cristallisation isotherme et le comportement de fusion évalués en termes de début de cristallisation ( $t_{0nC}$ ) (A), pic de cristallisation ( $t_c$ ) (B), enthalpie de cristallisation ( $\Delta H$ ) (C), pic de température ( $T_p$ ) (D) et enthalpie ( $\Delta H$ ) (E) de PO et PO avec EsOF et EsOS ( $p < 0,05$ ). PO : huile de palme, EsOF : huile essentielle des fleurs de *P. scoparius*, EsOS : huile essentielle des tiges de *P. scoparius*. Enthalpy : enthalpies de fusion et cristallisation.



En général, les temps de cristallisation de pic ( $t_c$ ) de PO n'ont pas été affectés par l'addition des EsO (Figure 38B,  $p > 0,05$ ). A mesure que les températures de cristallisation augmentent, les valeurs de  $t_c$  augmentent et ne sont généralement pas affectées par l'addition des EsO. Les différences n'ont été constatées que lorsque les échantillons ont été cristallisés à 22 et 24 °C. Lorsque PO a été cristallisé à 22 °C, l'addition de EsOF a augmenté  $t_c$ , suggérant que les molécules présentes dans cette huile ont retardé la cristallisation de PO. Aucun effet sur  $t_c$  n'a été observé lorsque PO a été cristallisé avec EsOS. Des résultats similaires ont été observés pour les échantillons cristallisés à 24 °C. Les enthalpies de cristallisation diminuent avec la température de cristallisation et ne sont pas affectées par l'addition de EsOF et EsOS (Figure 38C,  $p > 0,05$ ).

Les profils de cristallisation isotherme obtenus en Figure 37 sont en accord avec les résultats rapportés par Ng et Oh (1994) quant à la présence de ces pics dans PO à des températures de 20 à 23 °C. La disparition du premier pic à 24 °C est due à la différence dans le degré de sur-refroidissement (ou force motrice) responsable de la formation de cristaux à différents points de fusion. Shahidi (2005) attribue ces pics à des fractions oléique et stéarique et suggère que la composition complexe des TAG de PO est responsable des comportements de cristallisation et de fusion observés. D'autres auteurs ont attribué ces deux pics à deux formes polymorphiques différentes (Rigolle *et al.*, 2015). Verstringe *et al.* (2013) ont étudié l'effet de différentes concentrations de monopalmitine pure sur le comportement de cristallisation de l'huile de palme. La cristallisation isotherme de PO a révélé une cristallisation en deux étapes avec formation de cristaux  $\alpha$  dans la première étape et cristaux  $\beta'_1$  dans la seconde étape. Dewettinck *et al.* (2004) ont suggéré que la cristallisation isotherme du beurre de cacao est un processus se déroulant en deux étapes. La cristallisation initiale de la forme  $\alpha$  conduit à des formes plus stables via des transitions polymorphiques.

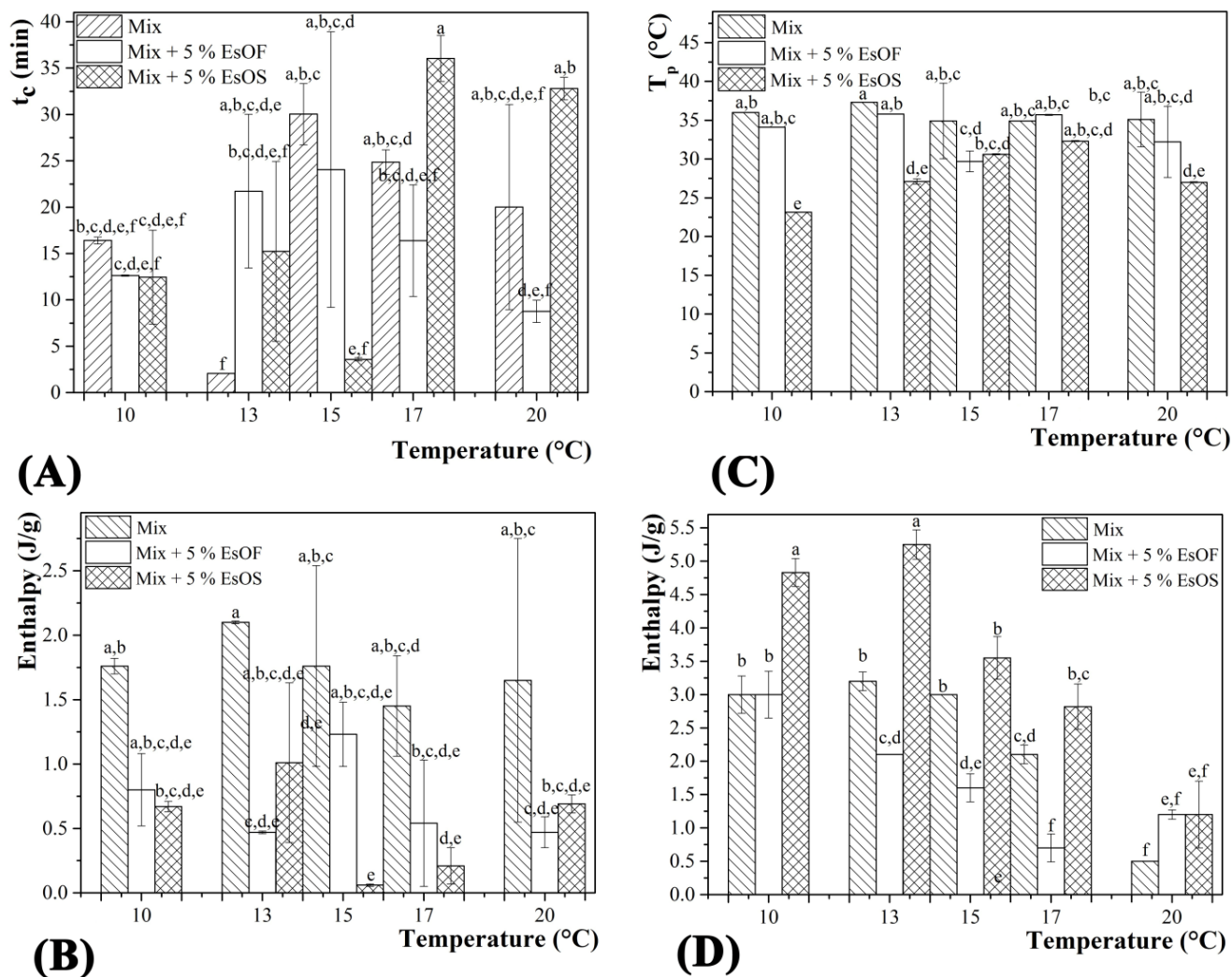
Les Figures 38D-E montrent les paramètres de la fusion des échantillons étudiés. Dans plusieurs cas, la  $T_{on}$  n'a pas été déterminée car cette valeur s'écarte de l'intervalle des températures de l'expérimentation. Les  $T_P$  obtenues pour les différents échantillons (PO avec et sans EsOF et EsOS) ont été affectées par les températures de cristallisation ( $T_c$ ). Les  $T_P$  ont augmentées de façon significative avec l'augmentation des  $T_c$  (Figure 38D,  $p < 0,05$ ). Cependant, aucune différence de  $T_P$  n'a été observée entre les échantillons de PO et PO avec les EsO. Les enthalpies de fusion ont également été affectées par  $T_c$  ( $p < 0,05$ ) et des enthalpies de fusion inférieures ont été obtenues à des  $T_c$  supérieures (Figure 38E).



**Figure 39** : courbes de cristallisation isothermes DSC de Mix avec et sans addition des huiles essentielles des fleurs et des tiges de *P. scoparius* à 10 (A), 13 (B), 15 (C), 17 (D) et 20°C (E). Mix : mélange des huiles végétales de tournesol, soja et palme, EsOF : huile essentielle des fleurs de *P. scoparius*, EsOS : huile essentielle des tiges de *P. scoparius*. Heat flow : débit de chaleur.

En outre, les valeurs d'enthalpie de fusion ont été affectées par l'addition des EsO. De manière générale, des enthalpies de fusion plus élevées ont été obtenues pour le PO cristallisé sans addition des EsO ( $p < 0,05$ ). Des enthalpies de fusion basses suggèrent un bas degré de cristallinité dans l'échantillon, signifiant que l'addition des EsO retarde la cristallisation de PO, surtout à basses  $T_c$ . A partir des travaux publiés antérieurement sur l'effet du limonène dans la cristallisation du beurre de cacao pur, une diminution significative de l'enthalpie de fusion a été constatée lors de l'addition du limonène dans les concentrations entre 0 à 5% (Rigolle *et al.*, 2016). Cela a été expliqué par une inhibition de la cristallisation du beurre de cacao pur par le limonène. Puisque les EsOF et les EsOS de *P. scoparius* contiennent du limonène et d'autres terpènes (**Tableau 1, manuscrit soumis pour publication**), on suppose que les mêmes phénomènes se produisent dans PO lorsque les EsO précédentes sont ajoutées à 5%. Selon les données présentées dans les Figures 38A-E, l'addition de EsOF a eu un effet plus important sur le comportement de fusion de PO par rapport à EsOS ( $p < 0,05$ ).

La Figure 39 montre les profils DSC de cristallisation isotherme obtenus dans le Mix et le Mix additionné de EsOF et EsOS et en Figures 40A-D les paramètres associés à ce processus. Les pics de cristallisation obtenus pour les échantillons de Mix sont plus petits par rapport à ceux obtenus pour les échantillons de PO et par conséquent leur visualisation (Figure 39) est plus délicate. La Figure 39A montre les profils de cristallisation isotherme des échantillons cristallisés à 10 °C. L'apparition d'un grand pic exothermique est clairement constatée dans tous les profils et un petit pic de chevauchement apparaît aussi dans Mix avec EsOF et EsOS. Ce petit pic apparaît dans le Mix à 13 °C mais disparaît rapidement dans les deux autres échantillons. Le pic principal est décalé vers des temps supérieurs jusqu'à disparaître à 15, 17 et 20 °C. Dans de nombreux cas, le  $t_{on}$  n'a pas été calculé car les temps de début de cristallisation s'écartent des valeurs calculées par intégration des pics. Par conséquent, ces valeurs n'ont pas été rapportées pour Mix. La Figure 40A montre que  $t_c$  de Mix n'a pas été affecté par l'addition des huiles essentielles lorsqu'il est cristallisé à 10 °C. Cependant, lorsque Mix est cristallisé à 13 °C, un petit pic pointu s'est formé à des stades très précoces du processus de cristallisation, diminuant le  $t_c$  à 2,06 min. Ce pic était absent dans les échantillons cristallisés avec les EsO, augmentant les valeurs de  $t_c$  de 21,73 min et 15,23 min pour Mix EsOF et EsOS, respectivement ( $p < 0,05$ ). Ces résultats suggèrent que l'addition des EsO à 13 °C a retardé le fractionnement du Mix et un seul pic de cristallisation a été observé.



**Figure 40 :** cristallisation isotherme et comportement de fusion de Mix et Mix avec les huiles essentielles étudiées de (A) pic de cristallisation ( $t_c$ ), (B) enthalpie de cristallisation ( $\Delta H$ ), (C) pic de température ( $T_p$ ) et (D) enthalpie de fusion ( $\Delta H$ ) ( $p < 0,05$ ). Mix : mélange des huiles végétales de tournesol, soja et palme. EsOF : huile essentielle des fleurs de *P. scoparius*, EsOS : huile essentielle des tiges de *P. scoparius*. Enthalpy : enthalpies de fusion et cristallisation.

A des températures de cristallisation plus élevées, l'addition des EsO a soit diminuée  $t_c$  ( $p < 0,05$ ) (cas des échantillons cristallisés à 15 °C avec EsOS) ou a plutôt augmenté les valeurs de  $t_c$  ( $p < 0,05$ ) (cas des échantillons cristallisés à 17 °C avec EsOS). Les enthalpies de cristallisation sont très petites et en général aucune différence n'est observée en fonction de  $T_c$  ou de l'addition des EsO. Les seules exceptions sont les échantillons cristallisés à 13 et à 15 °C, où l'addition respective des EsOF et EsOS a diminué significativement l'enthalpie de cristallisation ( $p < 0,05$ ).

Les données du comportement de fusion des Mix, Mix avec EsOF et Mix avec EsOS sont montrées en Figures 40C-D. La température maximale ( $T_p$ ) et l'enthalpie de fusion ( $\Delta H$ ) ont été également rapportées. Les températures de début de fusion ( $T_{on}$ ) du Mix avec EsOF et Mix avec EsOS ne sont pas déterminées pour les températures étudiées, à l'exception des échantillons cristallisés à 17 °C pour Mix avec EsOF (28,8 °C), puisque ces températures s'écartent des valeurs de températures de fusion calculées par intégration des pics. Les valeurs de  $T_p$  des échantillons de Mix n'ont pas été affectées par  $T_c$  et une diminution significative ( $p < 0,05$ ) des valeurs de  $T_p$  a été observée pour les échantillons de Mix avec EsOF cristallisés à 15 °C, alors qu'une augmentation significative de  $T_p$  a été observée pour les échantillons Mix avec EsOS à 15 et 17 °C (Figure 40C,  $p < 0,05$ ). L'addition de EsOS a diminué  $T_p$  lorsque les échantillons de Mix ont été cristallisés à 10, 13 et 20 °C ( $p < 0,05$ ) alors que l'addition de EsOF n'a pas affecté les valeurs de  $T_p$  ( $p > 0,05$ ) des échantillons de Mix. Les enthalpies de fusion ont diminué à mesure que  $T_c$  augmentait pour tous les échantillons ( $p < 0,05$ ) (Figure 40D). Les enthalpies de fusion calculées à 10 et 13 °C respectivement de Mix avec EsOS (4,83 et 5,25 J/g) sont plus élevées que celles du Mix avec EsOF (3,0 et 2,1 J/g) et Mix témoin (3,0 et 3,2 J/g) ( $p < 0,05$ ), suggérant que EsOS favorise la cristallisation dans le Mix tandis que EsOF l'inhibe (Figure 40D). A 15 et 17 °C, aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) n'a été observée entre le Mix témoin (3,0 et 2,1 J/g) et le Mix avec EsOS (3,55 et 2,82 J/g) alors qu'une enthalpie de fusion significativement plus faible a été observée pour les échantillons de Mix avec EsOF (1,6 et 0,7 J/g) ( $p < 0,05$ ). Enfin, l'addition des EsO n'a pas affecté l'enthalpie de fusion des échantillons de Mix cristallisés à 20 °C.

L'addition à 5% des deux EsO (EsOF et EsOS) de *P. scoparius* a provoqué un changement dans les profils de cristallisation isotherme pour toutes les températures de refroidissement étudiées. Les études sur l'effet de l'addition des huiles essentielles dans les corps gras sont limitées à l'effet de l'addition du limonène dans le beurre de cacao pur ou le chocolat. Do *et al.* (2008) ont étudié l'effet adoucissant du limonène (monoterpène hydrocarboné) dans un chocolat

allégé. Ils ont émis l'hypothèse que l'action de celui-ci se traduit par deux aspects : *i*) le limonène, qui ne cristallise pas lors de son incorporation, provoque vraisemblablement un la dilution du système et *ii*) son addition peut influencer sur le comportement de cristallisation du corps gras dans lequel il a été incorporé empêchant la cristallisation des TAG. Dans une autre investigation, Ray *et al.* (2012) ont rapporté que l'effet du limonène pourrait être dû à une plastification des chaînes de TAG par un mécanisme similaire à celui de l'effet de dilution. En outre, il abaisse les temps d'induction pour la cristallisation isotherme et accélère la transition de phase des formes polymorphiques moins stables aux formes les plus stables. Cet effet est également appuyé par les résultats de Miyasaki *et al.* (2015), Rigolle *et al.* (2016a) et Rigolle *et al.* (2016b) décrivant des effets similaires dans les substituts de beurre de cacao et le beurre de cacao pur, convergeant aux mêmes conclusions que celles des études antérieures. L'action du limonène est probablement expliquée par son action assimilée à une barrière physique, empêchant la cristallisation du beurre de cacao et provoquant une diminution prononcée de la cristallinité du corps gras.

Dans la présente étude, l'effet des EsO (EsOF et EsOS) ne peut pas être attribué à un effet de dilution, puisque les points de fusion de PO et Mix avec et sans l'addition des EsO n'ont pas montré une différence significative (Tableau 8) ( $p < 0,05$ ). Par conséquent, nos résultats peuvent être expliqués par la deuxième hypothèse de Do *et al.* (2008), pour laquelle le limonène affecte la cristallisation des corps gras. La composition des EsO de la présente étude montre la présence de plusieurs monoterpènes parmi lesquels le limonène est identifié dans EsOF (4,05%) et EsOS (1,47%). Cependant, d'autres monoterpènes majoritaires sont également présents menant à des interactions moléculaires encore plus complexes dans le réseau cristallin des TAG. Par conséquent, l'effet global ne peut être attribué à un seul composant comme dans le cas du limonène. Les structures chimiques des principaux monoterpènes des EsO étudiées ( $\alpha$ -pinène et sabinène) (Figure 35) sont bicycliques et dérivant de monoterpènes monocycliques. L' $\alpha$ -pinène (Figure 35A) est formé par un réarrangement intermoléculaire du cation  $\alpha$ -terpinyl intermédiaire alors que le sabinène (Figure 35B) est un monoterpène à noyau thujane dérivant du cation sabinyl (Thormar, 2010). Ces petites molécules de poids moléculaire relativement faibles et des structures chimiques totalement différentes des TAG, peuvent interférer pendant le processus de cristallisation. Ils sont probablement en compétition pour l'espace disponible dans le réseau cristallin avec les AG des TAG (probablement bien plus pour les sites de nucléation), entraînant un encombrement stérique. Do *et al.* (2008) ont rapporté que les

mélanges de matières ayant des volumes et des tailles moléculaires différentes (tels que limonène et TAG) entraînent des effets stériques suivant la règle des mélanges de Kay.

Si on considère que les EsO ajoutées à PO et Mix à une concentration de 5% (m/m) constituent des additifs, alors leur influence sur la cristallisation pourrait être similaire à celle des protéines et autres additifs non lipidiques. Smith *et al.* (2011) suggèrent qu'un additif est considéré comme étant un composé mineur lorsque sa concentration est faible devant les autres composés (5%) avant et après addition. Un composé mineur peut affecter à la fois la nucléation et la croissance des cristaux. Les effets peuvent concerner la modification du temps de la nucléation, le décalage de la température de celle-ci et le changement dans le nombre et la nature des nucléi formés. Dans une étude de l'effet de certains additifs sur la cristallisation isotherme de l'huile de coco, il a été démontré qu'un effet d'inhibition de la cinétique de cristallisation a été observé en utilisant l'acide laurique et les esters de saccharose comme additifs. Il a été suggéré que cet effet dépend de la dissimilitude dans la forme moléculaire. Plus la différence de la structure moléculaire entre les additifs et les corps gras est grande, plus l'effet d'inhibition de la cristallisation est prononcé (Chaleepa *et al.*, 2010). Les composés mineurs peuvent également affecter la croissance des cristaux et le polymorphisme. Dans un concept de similitude-dissimilitude des structures, les composés mineurs peuvent soit promouvoir la croissance des cristaux par la formation de sites de croissance supplémentaires, ou au contraire induire l'effet inverse en bloquant les sites de croissance et en incorporant les molécules additionnées dans la structure cristalline. En conséquence, un retard de la cristallisation et/ou un changement dans la morphologie cristalline se produisent (Shimamura *et al.*, 2013 ; Rincón-Cardona *et al.*, 2014 ; Patel et Dewettinck, 2015).

Dans la présente investigation, l'addition des EsO (EsOF et EsOS) a inhibé la cristallisation de PO (Figure 38C). Toutefois, l'effet de EsOF est plus significatif que celui observé pour EsOS, surtout aux basses températures de cristallisation. EsOF a également inhibé la cristallisation de Mix alors que EsOS l'a favorisée (Figure 40B). L'effet retardateur de EsOF sur la cristallisation est d'une certaine manière attendu vu la composition chimique caractéristique (**Tableau 1, article soumis pour publication**) et où la concentration du limonène (Figure 35F) est plus élevée (4,05%) dans EsOF que dans EsOS (1,47) ( $p < 0,05$ ). Rigolle *et al.* (2016a) et Miyasaki *et al.* (2015) ont suggéré que le limonène favorise la formation de polymorphes plus stables dans le beurre de cacao pur, mais retarde sa cristallisation globale comme peut en témoigner l'enthalpie de fusion plus faible. La présence d'autres composés pourraient également contribuer à l'effet observé dans la cristallisation de PO et Mix. Deux composés majoritaires

( $\alpha$ -pinène et sabinène) sont à des teneurs plus élevées en EsOS (respectivement de 34,51 et 25,59%) par rapport à EsOF (respectivement de 27,93% et 17,05%) ( $p < 0,05$ ). On peut émettre l'hypothèse que des concentrations plus élevées de ces composés majoritaires sont également responsables dans la promotion de la cristallisation de Mix, car leurs structures chimiques sont semblables à celle du limonène (présence de groupements méthylènes et de cycles aromatiques dans leurs structures chimiques).

### **5.3. Taux de solides (SFC)**

La teneur en solides (SFC), définie aussi comme la quantité de matière grasse solide dans le corps gras, est l'un des paramètres physiques associés aux attributs de qualité de plusieurs corps gras (margarine, shortenings, matières grasses tartinables). Il détermine l'adéquation des huiles ou des graisses pour des applications spécifiques telles que l'aspect, la facilité à l'emballage, l'exsudation de l'huile, les propriétés organoleptiques et la tartinabilité (Chu *et al.*, 2002 ; Saadi *et al.*, 2011 ; Karabulut *et al.*, 2004). Le SFC est utilisé pour établir une relation entre la consistance et la plasticité du produit (Karabulut *et al.*, 2006), mais aussi la compatibilité des graisses lorsqu'elles sont mélangées à des proportions différentes. Il peut être mesuré à l'aide de la RMN pulsée à basse résolution, technique très rapide, précise et non destructive (Nielsen, 2010). Le SFC peut être mesuré en fonction du temps pour suivre le processus de cristallisation (Chiavaro, 2014).

Les changements des SFC en fonction du temps de cristallisation de PO témoin et additionné des EsOF et EsOS aux températures respectives de 20, 21, 22, 23 et 24 °C sont présentés en Figure 2 (**article soumis pour publication**). Globalement, les effets de la température de cristallisation et l'addition des huiles essentielles sont évidents pour les échantillons de PO. A 20 °C (Figure 2A), PO a montré deux stades de cristallisation et une forme particulière de deux courbes hyperboliques, délimitées par un point (SFC = 8,16%) où deux zones sont clairement séparées: la zone entre 0 et 8 min et la zone entre 8 et 60 min. De plus, la cristallisation de l'échantillon commence instantanément sans aucune période d'induction apparente à cette basse température. Une cristallisation rapide se produit dans la première zone, atteignant un SFC de 8,45% et une seconde cristallisation rapide se produit juste après la première atteignant un SFC de 15,34% après 20 min du début de la cristallisation. Le SFC continue d'augmenter pour atteindre un SFC maximum (SFC<sub>max</sub>) d'environ 17,00%. Les échantillons de PO avec les EsO ajoutées ont montré une superposition des deux courbes des EsOF et EsOS et un comportement de cristallisation caractérisé par deux étapes. De la même manière que PO, aucun temps d'induction de cristallisation n'est observé pour les échantillons additionnés des EsO.



L'effet principal de leur addition est la diminution drastique du SFC. Une région semblable à un plateau est évidente après 30 min de cristallisation et des SFC d'environ 13,82% et 14,00% ont été atteints respectivement pour les échantillons de PO avec EsOF et EsOS. Une tendance similaire a été observée en Figure 2B pour les échantillons cristallisés à 21 °C, avec des SFC<sub>max</sub> de 12,55% et 12,81% pour les échantillons de PO avec EsOF et EsOS respectivement. Le SFC<sub>max</sub> de 15,64% a été atteint dans la région du plateau de PO. Une diminution significative ( $p < 0,05$ ) des valeurs de SFC a été observée lors de l'augmentation de la température de cristallisation de 20 à 21 °C pour PO témoin et avec les EsOs. A 22 °C (Figure 2C), la diminution de SFC est toujours observée dans tous les échantillons comparativement aux basses températures, avec une diminution prononcée des valeurs de SFC dans les échantillons de PO avec les EsOs par rapport au PO témoin. De la même manière que pour les températures précédentes, une forme hyperbolique de la courbe est observée et une superposition de SFC pour PO avec les EsOs. Une seule étape de cristallisation est observée à cette température. Toutefois, aucun temps d'induction de cristallisation n'est observé pour PO alors qu'une courte période d'induction est constatée pour les échantillons de PO avec les EsOs. En outre, une période plus lente de cristallisation juste après la période d'induction est observée. Les valeurs des SFC<sub>max</sub> de PO avec EsOF et EsOS étaient respectivement de 11,72% et 11,81%, inférieures à celle de PO (14,15%) (**Tableau 2,  $p < 0,05$  ; article soumis pour publication**). Aux températures de cristallisation de 23 °C (Figure 2D) et de 24 °C (Figure 2E), les courbes montrent toujours une forme hyperbolique avec observation d'une seule étape. Cependant, la cristallisation ne se produit pas instantanément dans tous les échantillons et une période d'induction est clairement identifiée. Les temps d'induction dans les échantillons de PO avec les EsO sont plus longs par rapport au PO témoin. Les courbes de PO avec EsOF et EsOS se superposent après la période d'induction, ainsi observé pour les températures précédentes. Néanmoins, la diminution de SFC dans les échantillons de PO avec les EsO est toujours aussi prononcée dans tous les échantillons, PO témoin montrant toujours des valeurs SFC plus élevées. Les valeurs de SFC<sub>max</sub> à 60 min pour toutes les températures étudiées sont significativement différentes entre les échantillons de PO témoin et PO avec EsOF et EsOS, mais de manière non significative entre les échantillons de PO avec les EsOs (Tableau 2,  $p < 0,05$ ).

La diminution des valeurs SFC observées en Figure 2 et Tableau 2 (**article soumis pour publication**) à mesure de l'augmentation de la température (de 20 à 24 °C) est due à la diminution du sur-refroidissement. La force motrice d'un liquide en fusion sur-refroidi qui subit

la cristallisation est déterminée par le degré de sur-refroidissement (Ghotra *et al.*, 2002), considéré comme un paramètre très important qui définit la façon avec laquelle la nucléation se produit (Herrera *et al.*, 1999). Plus le sur-refroidissement est élevé, plus la quantité de solides est élevée dans le PO témoin. Grosso modo, une diminution drastique des valeurs SFC est observée dans tous les échantillons de PO avec les EsO et à toutes les températures par rapport à celles du PO témoin. Ceci est compatible avec les données de cristallisation isotherme en DSC, dans lesquelles la cristallisation est plus lente lorsque la température est augmentée de 20 à 24 °C (PO) ou lorsque le sur-refroidissement diminue (Figures 38A-C). Il a également été observé que pour les sur-refroidissements élevés de 20, 21 et 22 °C, les périodes d'induction sont inexistantes ou très courtes alors qu'à de faibles sur-refroidissements de 23 et 24 °C une période d'induction existe. Lorsqu'aucune période d'induction n'est observée dans les échantillons à cristallisation rapide, les événements de nucléation et de croissance cristalline se produisent en très peu de temps et les taux de nucléation sont plus élevés en raison des basses barrières énergétiques atteintes lors de la nucléation. Par conséquent, de nombreuses cristallites sont formées avec élévation importante de l'énergie de surface. L'effet inverse est observé lorsque les sur-refroidissements sont faibles, ce qui conduit à des taux de nucléation faibles et la formation d'un nombre moindre de cristallites (Campos *et al.*, 2002). Une diminution des SFC se produit avec l'addition des EsOs, même si les points de fusion des échantillons sont assez proches les uns des autres (Tableau 8). Ceci permet de rejeter ainsi l'hypothèse d'un effet de dilution probable du système par les EsOs. Notre hypothèse est que la diffusion des TAG dans le réseau cristallin est limitée et freinée par les molécules de terpènes. En raison de leur petite taille et de leur faible poids moléculaires par rapport aux TAG, leur transfert de masse est favorisé et une compétition avec ces derniers pour l'espace dans le réseau cristallin est probablement l'un des facteurs qui explique le retardement de la cristallisation observée.

Comme indiqué précédemment, le SFC a augmenté dans tous les échantillons et les courbes SFC adoptent une allure sigmoïdale. Elles sont parfaitement ajustées au modèle d'Avrami ( $R^2 > 0,96$ ) (**Figure 2, article soumis pour publication**). L'effet d'inhibition par les EsOs de la cristallisation de PO est également démontré par la constante de vitesse  $k$  inférieure obtenue à partir de l'ajustement (fitting) au modèle d'Avrami. D'après la Figure 2, les valeurs de  $k$  ont diminué avec l'augmentation de  $T_c$ , mais aussi avec l'addition des EsO indiquant une cinétique de cristallisation plus lente. Les échantillons de PO cristallisés avec l'addition des EsOs ont montré des valeurs de  $n$  supérieures. La valeur de  $n$  représente l'indice de la réaction et est liée au comportement de la nucléation et de la croissance de l'échantillon. Les valeurs de  $n = 1$

représentent une croissance instantanée, les valeurs de  $n = 2$  représentent une croissance semblable à celle d'une tige et une nucléation sporadique ou une croissance en forme de disque et une nucléation instantanée; alors que les valeurs de  $n = 3$  ou  $n = 4$  représentent une croissance en forme de disques ou de spherulites. L'addition des EsO a eu très peu d'effet sur les valeurs de  $n$  à basses température (20 et 21 °C) avec des valeurs de  $n$  autour de 1 alors qu'une augmentation des valeurs de  $n$  de 1 à 2 a été observées à 22 °C, de 2 à 3 à 23 °C et de 2 à 4 à 24 °C. Ces changements dans les valeurs de  $n$  suggèrent que la présence des EsO a modifié les mécanismes de nucléation et de croissance de PO, d'une nucléation instantanée ou une morphologie en forme de tige à une morphologie en forme de disques de spherulites.

Les courbes SFC des échantillons de Mix et Mix avec EsOF et EsOS cristallisés à 10, 13, 15 et 17 °C sont présentés en Figure 3 (**article soumis pour publication**). Il convient de signaler que la courbe de cristallisation obtenue à 20 °C n'est pas présentée dans cette figure, parce que la teneur en solides était trop faible (< 1%) en raison de la température élevée (sur-refroidissement faible) de l'échantillon. En Figure 3A, le comportement de cristallisation des échantillons Mix témoin et Mix avec EsOF et EsOS à 10 °C est indiqué. Il est montré que la cristallisation est initiée sans temps d'induction dans les trois échantillons, de la même manière qu'avec les échantillons de PO cristallisés à basse température. Les courbes montrent une forme hyperbolique en deux étapes et deux zones peuvent être observées: dans la première zone (0 à 12 min) une cristallisation rapide pour est observée, avec des valeurs SFC légèrement différentes observées parmi les trois échantillons testés. La seconde zone (12 à 60 min) montre une cristallisation plus lente avec une superposition des courbes SFC pour les trois échantillons. Cependant, des valeurs inférieures de SFC sont observées pour les échantillons de Mix avec les EsO après environ 30 min. Le  $SFC_{max}$  atteint par le Mix témoin a été de 4,37% tandis que les échantillons de Mix avec EsOF et EsOS ont montré des  $SFC_{max}$  respectifs de 3,55% et 3,77%. L'addition des EsO a diminué significativement les valeurs de  $SFC_{max}$  (Tableau 2,  $p < 0,05$ ), mais aucune différence significative n'a été observée entre les échantillons Mix avec EsOF et EsOS ( $p < 0,05$ ). Dans les Figures 3B-D, l'effet de l'addition des EsO dans le Mix est plus prononcé. Les courbes présentent une forme hyperbolique, mais une seule étape pour la cristallisation a été observée dans ce cas. De plus, un temps d'induction a été observé dans tous les échantillons, le temps d'induction le plus long (30 min) a été observé dans les échantillons cristallisés à 17 °C. Il a été stipulé que la période d'induction et le développement cristallin deviennent plus longs à des températures de cristallisation plus élevées (Miskandar *et al.*, 2004). Idem aux résultats discutés pour PO, une augmentation de la température de cristallisation a

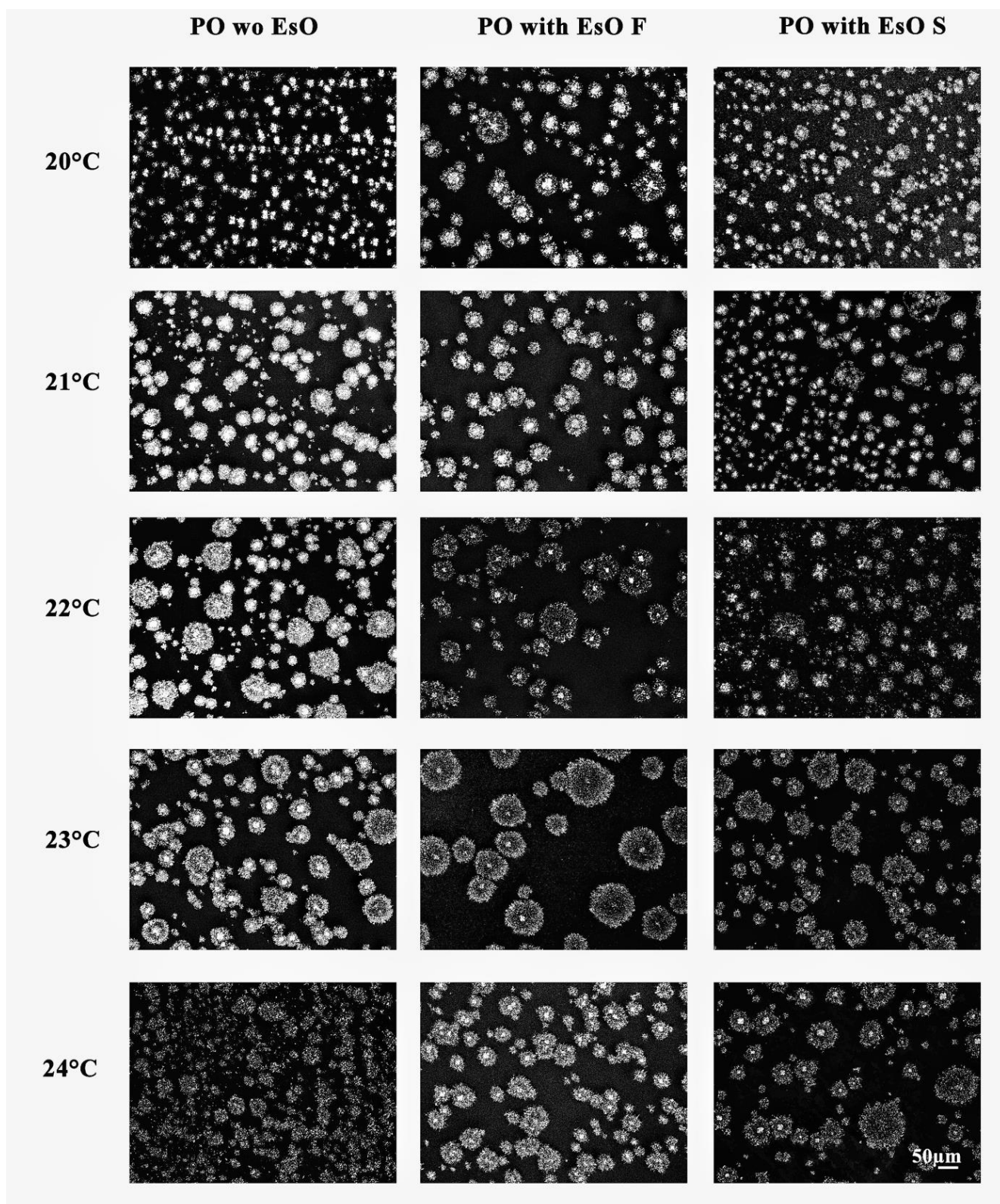
entraîné une diminution des valeurs SFC pour tous les échantillons ( $p < 0,05$ ). L'effet de l'addition des EsO est observé notamment à 17 °C et un SFC légèrement inférieur peut être observé pour le Mix avec EsOF par rapport aux deux autres échantillons.

Globalement, l'addition des EsO aux échantillons de PO et de Mix a diminué le  $SFC_{max}$ , suggérant que les EsO interfèrent avec la cristallisation de ces échantillons. Ces résultats corroborent avec la discussion de l'étude du comportement thermique par DSC présentée précédemment où de basses enthalpies de fusion ont été observées pour les échantillons avec EsO. L'exception à cette règle est observée au niveau des échantillons de Mix avec EsOS, où des enthalpies plus élevées ont été obtenues. Il est intéressant de noter que cet échantillon a un SFC légèrement plus élevé par rapport à l'échantillon avec EsOF (Tableau 2,  $p < 0,05$ ) et légèrement inférieur à celui observé pour le Mix témoin (Tableau 2,  $p > 0,05$ ). Les enthalpies de fusion sont utilisées pour évaluer la quantité de matière cristalline présente dans l'échantillon, mais aussi pour évaluer les interactions moléculaires dans un réseau cristallin. Dans le cas du Mix avec EsOS il est possible, même si la cristallisation est retardée, que les interactions moléculaires dans le réseau cristallin formé aient donné lieu à des valeurs d'enthalpie plus élevées. Notre hypothèse suggère que probablement un réseau cristallin plus ferme est formé dans ces conditions, nécessitant une plus grande énergie de fusion de l'échantillon même si la teneur en solides (SFC) est similaire.

Les courbes SFC en Figure 3 ont montré un bon ajustement au modèle d'Avrami ( $R^2 > 0,87$ ), à l'exception des courbes obtenues à 17 °C où le manque d'ajustement est probablement lié à l'absence de courbes sigmoïdales dans ces échantillons. L'ajustement avec le modèle d'Avrami montre que l'addition des EsO a diminué le taux de cristallisation (valeur  $k$  d'Avrami) et a augmenté les valeurs de  $n$ , comme déjà indiqué dans le cas des échantillons de PO avec addition des EsO.

#### **5.4. Microscopie à lumière polarisée (PLM)**

La microscopie à lumière polarisée est utilisée pour analyser les cristaux et les réseaux cristallins formés par les TAG. En raison de leur biréfringence, les cristaux de lipides apparaissent éclairés dans un fond sombre de l'huile liquide (Acevedo et Marangoni, 2015).



**Figure 41** : micrographes des échantillons PO cristallisés avec et sans les huiles essentielles de *P. scoparius* à 20, 21, 22, 23 et 24 °C (grossissement 10X, barre d'échelle: 50µm). wo : sans, with : avec, PO : huile de palme, EsOF : huile essentielle des fleurs de *P. scoparius*, EsOS : huile essentielle des tiges de *P. scoparius*.

La phase solide anisotrope réfracte la lumière différemment de la phase liquide isotrope sous la lumière polarisée du microscope (Narine et Marangoni, 1999).

La Figure 41 montre la morphologie cristalline du PO cristallisé en absence (témoin) et présence des EsOF et EsOS, via les micrographies obtenues pour les échantillons cristallisés à 20, 21, 22, 23 et 24 °C après 60 min. Deux morphologies différentes peuvent être observées pour les températures étudiées. La forme, la taille et le nombre de cristaux dans les trois échantillons sont différents et sont fonction de la température.

Une première analyse d'image par le logiciel ImageJ a permis d'aboutir aux résultats ci-après. Trois descripteurs ont été utilisés : la circularité (C), la surface totale (TA) et le diamètre minimum (Min D) (Tableau 9). D'une part, la circularité des cristaux (C) (descripteur de forme) de PO témoin à 20 °C est significativement différente par rapport à celles de PO avec EsOF et EsOS ( $p < 0,05$ ). D'autre part, la circularité des cristaux de PO témoin à 24 °C est significativement différente par rapport à celle de PO avec EsOF, mais non significativement différente de celle avec EsOS ( $p < 0,05$ ). Il n'y a aucune différence significative dans la circularité des cristaux de PO témoin par rapport au PO additionné de EsOF et EsOS aux températures de 21, 22 et 23 °C (Tableau 6) ( $p < 0,05$ ).

A 20 °C, l'addition de EsOS à PO a entraîné une réduction de la surface totale des cristaux ( $12,67 \text{ cm}^2$ ) par rapport à celle de PO témoin ( $p < 0,05$ ). Aucune différence significative n'a été observée entre PO et PO avec EsOF ( $p < 0,05$ ). Cependant à 22 °C, la surface totale des cristaux de PO témoin ( $27,67 \text{ cm}^2$ ) est significativement plus élevée que celle de PO avec EsOF ( $9,48 \text{ cm}^2$ ) et de PO avec EsOS ( $10,73 \text{ cm}^2$ ). La surface totale de PO témoin n'est pas significativement différente par rapport au PO avec EsOF et EsOS à 21, 23 et 24 °C (Tableau 6) ( $p < 0,05$ ).

Les cristaux de PO croissent à mesure que la température augmente (ou que la force motrice diminue) de 20 à 24 °C. A 20 °C, le réseau cristallin de PO témoin est caractérisé par de petits cristaux sphériques (sphérulites) et une distribution homogène au sein de l'huile liquide. PO avec EsOF et EsOS donnent le même type de réseau (nombre et forme similaires des cristaux). Cependant, ils diffèrent dans ces paramètres lorsqu'ils sont comparés au PO témoin. Le diamètre maximal des cristaux évalués pour tous les échantillons et les températures étudiés est de  $255 \mu\text{m}$ . Cependant, le diamètre minimal des cristaux (Min D) des échantillons montre des variations pour certains échantillons et pour certaines températures par rapport à d'autres (Tableau 6).

**Tableau 6** : analyse cristalline de PO et Mix avec et sans les EsO étudiées.

Echantillon	T (°C)	C	TA (cm <sup>2</sup> )	Min D (µm)
PO	20	0.81 ± 0.01 <sup>e</sup>	31.57 ± 2.04 <sup>a</sup>	112.58 ± 6.78 <sup>c,d,e</sup>
	21	0.87 ± 0.01 <sup>b,c,d</sup>	18.45 ± 7.34 <sup>b,c,d</sup>	148.21 ± 18.33 <sup>a,b,c,d</sup>
	22	0.86 ± 0.04 <sup>c,d</sup>	27.67 ± 1.58 <sup>a,b</sup>	94.53 ± 5.92 <sup>d,e</sup>
	23	0.87 ± 0.00 <sup>b,c,d</sup>	17.56 ± 3.46 <sup>b,c,d</sup>	139.86 ± 26.55 <sup>a,b,c,d</sup>
	24	0.89 ± 0.01 <sup>a,b</sup>	10.82 ± 0.63 <sup>c,d</sup>	155.22 ± 2.08 <sup>a,b,c</sup>
PO+5% EsOF	20	0.87 ± 0.01 <sup>b,c,d</sup>	19.14 ± 2.14 <sup>a,b,c</sup>	132.23 ± 12.55 <sup>b,c,d,e</sup>
	21	0.87 ± 0.02 <sup>b,c,d</sup>	26.60 ± 1.72 <sup>a,b</sup>	83.03 ± 16.03 <sup>e</sup>
	22	0.87 ± 0.00 <sup>a,b,c,d</sup>	9.48 ± 0.20 <sup>c,d</sup>	160.28 ± 7.40 <sup>a,b,c</sup>
	23	0.87 ± 0.00 <sup>b,c,d</sup>	12.15 ± 0.41 <sup>c,d</sup>	169.65 ± 4.71 <sup>a,b</sup>
	24	0.85 ± 0.02 <sup>d</sup>	15.51 ± 1.93 <sup>b,c,d</sup>	169.10 ± 8.62 <sup>a,b,c</sup>
PO+5% EsOS	20	0.88 ± 0.01 <sup>a,b,c</sup>	12.67 ± 0.59 <sup>c,d</sup>	119.79 ± 9.62 <sup>b,c,d,e</sup>
	21	0.87 ± 0.00 <sup>a,b,c,d</sup>	20.16 ± 1.07 <sup>a,b,c</sup>	120.19 ± 2.55 <sup>b,c,d,e</sup>
	22	0.87 ± 0.00 <sup>b,c,d</sup>	10.73 ± 3.03 <sup>c,d</sup>	190.43 ± 10.48 <sup>a</sup>
	23	0.88 ± 0.03 <sup>a,b,c</sup>	6.20 ± 0.76 <sup>d</sup>	157.42 ± 0.64 <sup>a,b,c</sup>
	24	0.90 ± 0.01 <sup>a</sup>	5.97 ± 0.61 <sup>d</sup>	153.85 ± 3.32 <sup>a,b,c</sup>
Mix	10	0.87 ± 0.02 <sup>a,b,c</sup>	4.02 ± 0.76 <sup>e,f,g,h</sup>	196.97 ± 3.94 <sup>a,b,c,d</sup>
	13	0.88 ± 0.02 <sup>a,b</sup>	3.74 ± 0.45 <sup>e,f,g,h</sup>	203.90 ± 4.96 <sup>a,b,c</sup>
	15	0.88 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.06 <sup>h</sup>	223.31 ± 7.34 <sup>a</sup>
	17	0.84 ± 0.01 <sup>c,d,e,f</sup>	8.32 ± 0.75 <sup>c,d,e</sup>	176.19 ± 5.37 <sup>a,b,c,d,e</sup>
	20	0.80 ± 0.00 <sup>g</sup>	8.21 ± 0.70 <sup>c,d,e</sup>	145.59 ± 16.93 <sup>e</sup>
Mix+5% EsOF	10	0.82 ± 0.02 <sup>f,g</sup>	17.76 ± 0.71 <sup>a</sup>	147.50 ± 5.80 <sup>e</sup>
	13	0.84 ± 0.01 <sup>c,d,e,f</sup>	10.32 ± 0.89 <sup>b,c,d</sup>	177.01 ± 8.54 <sup>a,b,c,d,e</sup>
	15	0.84 ± 0.01 <sup>d,e,f</sup>	6.64 ± 0.29 <sup>c,d,e,f,g</sup>	166.76 ± 19.07 <sup>b,c,d,e</sup>
	17	0.83 ± 0.04 <sup>d,e,f,g</sup>	7.45 ± 0.55 <sup>c,d,e,f</sup>	158.06 ± 3.33 <sup>c,d,e</sup>
	20	0.86 ± 0.02 <sup>a,b,c,d</sup>	6.22 ± 1.69 <sup>d,e,f,g</sup>	153.21 ± 17.88 <sup>d,e</sup>
Mix+5% EsOS	10	0.82 ± 0.01 <sup>e,f,g</sup>	15.54 ± 1.33 <sup>a,b</sup>	167.84 ± 24.78 <sup>b,c,d,e</sup>
	13	0.85 ± 0.01 <sup>b,c,d,e</sup>	2.31 ± 1.03 <sup>f,g,h</sup>	208.86 ± 8.41 <sup>a,b</sup>
	15	0.84 ± 0.01 <sup>d,e,f,g</sup>	6.64 ± 0.88 <sup>c,d,e</sup>	166.76 ± 57.21 <sup>a,b,c,d,e</sup>
	17	0.85 ± 0.02 <sup>c,d,e,f</sup>	11.54 ± 8.33 <sup>b,c</sup>	160.97 ± 33.77 <sup>b,c,d,e</sup>
	20	0.83 ± 0.01 <sup>d,e,f,g</sup>	1.94 ± 0.47 <sup>g,h</sup>	217.97 ± 12.70 <sup>a</sup>

T : température, C: circularité, TA : surface totale, Min D : diamètre minimum. PO : huile de palme, Mix : mélange des huiles végétales de tournesol, soja et palme, EsOF : huile essentielle des fleurs de *P. scoparius*, EsOS : huile essentielle des tiges de *P. scoparius*. Les résultats sont présentés en moyennes ± SD de trois répétitions. Les moyennes n'ayant pas la même lettre en exposant dans chaque ligne sont significativement différentes (p < 0,05).

A 21 °C, PO témoin présente un diamètre minimum plus grand (148,21 µm) par rapport à celui de PO avec EsOF (83,03 µm) ( $p < 0,05$ ). L'addition de EsOS dans PO n'a pas affecté significativement le diamètre minimal des cristaux par rapport à au PO témoin ( $p < 0,05$ ). A 22 °C, l'addition de EsOF et EsOS dans PO affecte significativement le diamètre minimal des cristaux. Des diamètres minimaux des cristaux plus grands sont obtenus dans les échantillons de PO avec EsOF et EsOS, respectivement de 160,28 µm et 190,43 µm par rapport au diamètre minimal des cristaux de PO témoin (94,53 µm) ( $p < 0,05$ ). Toutefois, le diamètre minimal des cristaux des échantillons n'a pas varié de façon significative à 20, 23 et 24 °C ( $p < 0,05$ ).

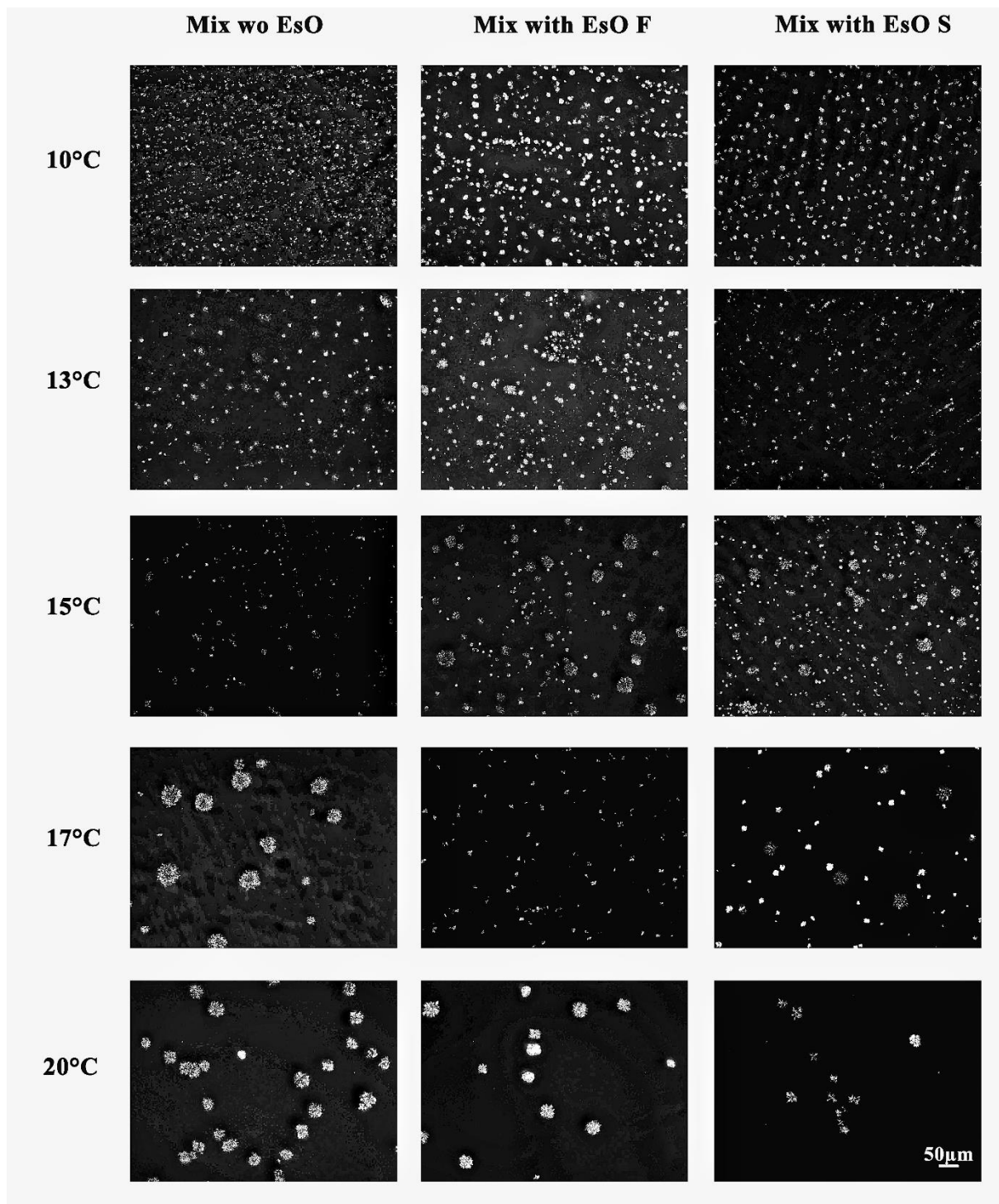
Au fur et à mesure que la température augmente, les vides entre les sphérulites dans les échantillons de PO avec EsOF et EsOS augmentent, ce qui signifie que la zone de cristallisation est réduite par rapport à ce qui est observé dans PO témoin. La présence de deux populations de cristaux avec différentes tailles pour les sphérulites est évidente à 24 °C pour PO avec EsOF. A cette température, PO forme un réseau plus dense avec quelques vides entre ces sphérulites. Les deux populations sont moins claires dans PO et PO avec EsOS (Figure 41). On peut conclure que l'addition des EsO a affecté la microstructure de PO en changeant son comportement cristallin. De plus grands cristaux et une zone moins cristallisée observée pour ces échantillons sont compatibles avec un retard dans la cristallisation (résultats DSC et SFC).

La Figure 42 montre les micrographies isothermes du Mix et Mix avec EsOF et EsOS cristallisés à 10, 13, 15, 17 et 20 °C. La morphologie cristalline est observée après avoir laissé les échantillons cristalliser pendant une période de 60 min. De la même manière que ce qui a été décrit précédemment, les cristaux ont une forme caractéristique de celles des sphérulites.

La circularité (C) des cristaux de Mix témoin et Mix avec EsOF et EsOS sont rapportées en Tableau 6. La circularité de Mix témoin est différente de celle de Mix avec EsO pour certaines températures. Ainsi, il existe une différence significative dans la circularité des cristaux de Mix témoin par rapport au Mix avec EsOF et EsOS pour les températures de 10, 13 et 15 °C ( $p < 0,05$ ). Aucune différence significative n'est observée pour les échantillons à la température de 17 °C, alors qu'une différence significative existe entre le Mix témoin et Mix avec EsOF à 20 °C ( $p < 0,05$ ).

Deux populations de cristaux sont également observées dans ce cas. Les échantillons présentent des différences de forme, de taille et de nombre de cristaux pour toutes les températures étudiées. A 10 °C, la surface totale évaluée dans les échantillons de Mix avec EsOF et EsOS est significativement plus grande (respectivement de 17,76 cm<sup>2</sup> et 15,54 cm<sup>2</sup>) que





**Figure 42 :** micrographes des échantillons Mix cristallisés avec et sans les huiles essentielles de *P. scoparius* à 10, 13, 15, 17 et 20 °C (grossissement 10X, barre d'échelle: 50µm). ). wo : sans, with : avec, Mix : mélange des huiles végétales de tournesol, soja et palme, EsOF : huile essentielle des fleurs de *P. scoparius*, EsOS : huile essentielle des tiges de *P. scoparius*.

celle de Mix témoin ( $4,02 \text{ cm}^2$ ) ( $p < 0,05$ ). La surface totale dans le Mix témoin est significativement différente de celle du Mix avec EsOF à  $13 \text{ }^\circ\text{C}$ , alors qu'elle est significativement différente de celle de Mix avec EsOS à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ).

L'effet de la température est évident dans tous les échantillons. A mesure que la température augmente, moins de cristaux sont observés et la fusion des cristaux provoque l'augmentation de la proportion de l'huile liquide. A très basses températures ( $10, 13$  et  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ ), les cristaux sont plus petits, nombreux et distribués uniformément alors qu'à des températures de  $17$  et  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  moins de cristaux plus grands sont observés. A  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , le diamètre minimal dans le Mix avec EsOS ( $217,97 \text{ }\mu\text{m}$ ) est significativement plus grand que celui du témoin ( $145,59 \text{ }\mu\text{m}$ ) et Mix avec EsOF ( $153,21 \text{ }\mu\text{m}$ ) ( $p < 0,05$ ). A  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , le diamètre minimal des cristaux dans le Mix témoin ( $196,97 \text{ }\mu\text{m}$ ) est significativement plus grand que dans Mix avec EsOF ( $147,50 \text{ }\mu\text{m}$ ). A  $17 \text{ }^\circ\text{C}$ , aucune différence significative n'est pas observée dans les échantillons ( $p < 0,05$ ). A  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ , le diamètre minimal des cristaux dans le Mix témoin ( $223,31 \text{ }\mu\text{m}$ ) est significativement plus élevé que dans Mix avec EsOF ( $166,76 \text{ }\mu\text{m}$ ). Aucune différence significative n'est observée pour les échantillons à  $13 \text{ }^\circ\text{C}$  (Tableau 6,  $p < 0,05$ ).

La présence de deux populations de cristaux est plus évidente à  $17 \text{ }^\circ\text{C}$ . A cette température, la cristallisation est si lente qu'elle permet la formation de grands cristaux dans le Mix mais non dans le Mix avec EsOF et EsOS. A  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , l'huile liquide devient la phase majoritaire dans le milieu et très peu de cristaux sont observés (Figure 42). Ceci est cohérent avec les résultats des SFC, où l'augmentation de la température abaisse les SFC des échantillons et une fusion des cristaux prédomine. L'addition de EsOF et EsOS dans le Mix a entraîné un changement dans le comportement cristallin et l'apparition d'une microstructure totalement différente dans les échantillons.

L'analyse d'image par ImageJ a été complétée par une autre analyse d'image à l'aide d'un logiciel plus spécifique dans l'analyse des cristaux : Image-Pro Premier. Contrairement à l'analyse précédente, le seul descripteur utilisé dans ce cas est le rayon du cristal. La taille des cristaux singuliers sont indiquées en Tableau 3 (**article soumis pour publication**).

Les cristaux de PO croissent et grossissent à mesure que la température augmente (ou que la force motrice diminue) de  $20$  à  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ . A  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , le réseau cristallin de PO est caractérisé par de petites formes sphériques (sphérulites) et une distribution homogène à travers la surface de l'huile liquide. PO avec EsOF et EsOS ont donné le même type de réseau cristallin, une forme similaire et un même nombre de cristaux dans les deux cas mais des cristaux de plus grande

taille. Aucune différence significative n'a été observée suite à l'addition des EsO pour le PO cristallisé à 20 et 21 °C. Cependant, certaines différences sont observées au fur et à mesure que  $T_c$  augmente. Lorsque PO est cristallisé à 22 °C, une augmentation significative de la taille des cristaux est observée pour les échantillons PO cristallisés avec EsOF ( $p < 0,05$ ). Comme évoqué précédemment, PO et PO avec EsOS sont composés de deux populations de cristaux de différentes tailles. L'absence d'une population de cristaux plus petits dans PO avec EsOF résulte par le développement de cristaux de plus grande taille (Tableau 3). Les échantillons de PO et de PO avec EsOF cristallisés à 23 °C ont des tailles cristallines plus grandes que celles des échantillons de PO avec EsOS (Tableau 3,  $p < 0,05$ ). Comme décrit précédemment, la taille moyenne cristalline plus petite rapportée pour PO avec EsOS est due à la présence d'une quantité importante de plus petits cristaux (Figure 41). Enfin, PO avec EsOF et EsOS cristallisés à 24 °C ont des cristaux de tailles similaires ( $p > 0,05$ ) qui sont plus grands que ceux obtenus dans le cas de PO témoin. Globalement, ces résultats montrent que l'addition des EsO dans PO augmente la taille des cristaux ou bien au contraire n'a aucun effet en fonction de  $T_c$  étudiée. De plus grandes tailles pour les cristaux sont une conséquence d'un retard dans la cristallisation provoqué par les EsO.

Les images des cristaux obtenues pour le Mix cristallisés avec et sans addition des EsO (Figure 42) montrent des cristaux en forme de petites sphérulites qui augmentent à mesure que la température de cristallisation augmente. Les cristaux obtenus dans les échantillons de Mix sont sensiblement plus petits par rapport à ceux obtenus pour les échantillons de PO. L'addition des EsO n'a pas affecté la taille cristalline du Mix lorsqu'elle est cristallisée à 10-13 °C et à 20 °C (Tableau 3). Des cristaux significativement plus petits ( $p < 0,05$ ) ont été obtenus lorsque l'échantillon de Mix a été cristallisé avec EsOF à 17 °C.

Ces résultats permettent d'appuyer ceux des SFC précédemment rapportés, où l'augmentation de la température abaisse les SFC des échantillons et une fusion conséquente des cristaux prédomine. L'addition des EsO dans le Mix a entraîné un changement dans le comportement de cristallisation et l'apparition d'une microstructure totalement différente dans les échantillons.

## **6. Contribution de l'analyse en composantes principales (ACP) dans l'évaluation sensorielle**

La définition d'une seule variable dépendante dans un design expérimental relève le plus souvent de l'analyse de la variance (ANOVA). L'usage d'une seule variable dans une expérimentation relève plutôt de l'exception que de la règle, car en sciences naturelles un nombre faramineux de variables est étudié simultanément (Zwanenburg *et al.*, 2011). Dans ce sens, les analyses multivariées comme l'analyse en composantes principales (ACP) et la régression en composantes principales (RCP) sont actuellement utilisées pour l'étalonnage de routine des appareils et le traitement des données (Vogt et Tacke, 2002). L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode statistique qui permet la transformation linéaire d'un ensemble de variables important en un autre réduit de variables non corrélées dites composantes principales (Thalib *et al.*, 1999). Plusieurs tableaux et graphes sont construits à l'issue de cette analyse et aident à l'observation des principaux résultats. Des représentations en biplot permettent : i) d'établir des relations directes entre les données structurées observées et les variables d'origine et ii) de prédire et d'extrapoler par rapport aux données traitées (Rui Alves et Beatriz Oliveira, 2003).

Une évaluation sensorielle via un test hédonique a été réalisée pour les émulsions élaborées à l'échelle laboratoire incorporées de 100, 300 et 600 de l'EsO de *P. scoparius*. Un nombre de dix attributs sensoriel a été retenu : aspect, doux, fondant en bouche, texture, saveur du beurre, saveur de la margarine, crémeux, salé, tartinabilité et arrière-goût. Le choix de ces attributs a reposé sur des travaux antérieurs publiés avec la même procédure pour l'évaluation sensorielle (Chikhouné *et al.*, 2014). La compréhension des relations entre leurs attributs sensoriels a fait l'objet d'une investigation via une approche statistique par analyse en composantes principales (ACP) et une représentation graphique en biplot (**Figures 5A et B, Publication n°1**). Les deux premiers axes des composantes principales ont permis d'expliquer 43,6% et de visualiser la projection des quatre émulsions étudiées (Figure 5B). La première composante principale expliquant 27,15% de la variabilité a été principalement caractérisée par le doux, le fondant en bouche et l'aspect (partie droite et positive de l'axe), alors que la tartinabilité et l'arrière-goût ont été localisés dans la partie négative gauche. La seconde composante principale expliquant 16,5% de la variabilité a été principalement caractérisée par les attributs sensoriels de saveurs de beurre et de margarine et de la texture (partie droite et positive de l'axe). Les attributs sensoriels de salé et de crémeux ne sont pas bien représentés sur les deux axes des deux composantes principales. Leur implication dans la différenciation entre les émulsions semble

être faible. L'APC a permis la ségrégation des émulsions B (100ppm), C (300ppm), D (600ppm) par rapport à l'émulsion A (émulsion témoin avec 100ppm d' $\alpha$ -tocophérol). L'émulsion B a été appréciée pour sa tartinabilité et son arrière-goût, ces deux attributs étant projetés sur le côté droit de l'axe. En revanche, les émulsions C et D sont caractérisées par le doux, le fondant en bouche et l'aspect. Cette tendance peut être probablement expliquée par la concentration de l'huile essentielle dans chaque émulsion. Puisque les émulsions C et D sont positionnées l'une près de l'autre, on peut supposer que les dégustateurs n'ont pas pu distinguer les deux émulsions (300 et 600 ppm) comme pour l'émulsion contenant 100 ppm. Puisque l'huile essentielle est composée de substances volatiles (terpènes), leur perception par les dégustateurs diffère en fonction de leurs teneurs dans les émulsions.



L'objectif du présent travail de thèse s'était inscrit dans une dynamique articulée sur deux grands aspects : i) l'effet des extraits polyphénoliques des deux plantes *Pituranthos scoparius* et *Hibiscus sabdariffa* et l'huile essentielle de *P. scoparius* sur la stabilité oxydative d'une émulsion à base de lactosérum type spread et ii) l'effet des huiles essentielles de *P. scoparius* sur le comportement de cristallisation isotherme de l'huile de palme seule et l'huile de palme en mélange avec les huiles de tournesol et de soja. Différentes approches analytiques ont été adoptées afin de répondre à la problématique et aux objectifs liés à ces deux aspects. Un essai de valorisation du lactosérum a été réalisé avec succès dans le cadre de cette étude.

Les résultats de la stabilité oxydative des émulsions élaborées à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote ont montré un impact positif de l'incorporation des extraits phénoliques des deux plantes, mais aussi de l'huile essentielle de *P. scoparius* extraite par hydrodistillation. Les différentes concentrations testées ont montré un effet de protection contre l'oxydation forcé meilleur que celui des émulsions témoins contenant l' $\alpha$ -tocophérol comme antioxydant, à l'exception de l'émulsion incorporée de 100 ppm de l'extrait concentré de l'Hibiscus (USAC80) dont la période d'induction n'est pas significativement différente de celle du témoin ( $p > 0,05$ ). Les résultats des dosages spectrophotométriques et de la chromatographie expliquent dans une grande mesure cette protection contre l'oxydation, par la présence de molécules bioactives représentées par les différentes classes des antioxydants : acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanines et monoterpènes oxygénés. Cet effet antioxydant a été démontré via le test TLC-DPPH• par l'apparition de plusieurs fractions actives. Les extraits polyphénoliques ont montré également des valeurs élevées pour le pouvoir réducteur. Les mécanismes antioxydants impliqués relèvent de la nature des antioxydants impliqués.

L'étude des interactions protéine-polyphénols marque un des atouts majeurs des résultats de la thèse. Il a été montré en effet que des interactions s'établissent bel et bien au niveau de la phase aqueuse des émulsions. Les protéines du lactosérum semblent interagir avec les polyphénols des extraits incorporés, se traduisant par la formation de dimères spécifiques et de poids moléculaires bien déterminés. Les caséines et la  $\beta$ -LG ont été identifiées comme étant les protéines impliquées dans ces interactions, les anthocyanines sont probablement la composante polyphénolique entrant en liaison avec ces dernières. Il était intéressant de constater que la formation de ces dimères n'a pas affecté la stabilité oxydative des émulsions, suggérant que l'activité antioxydante des anthocyanines est préservée dans le complexe formé.

L'étude du comportement de cristallisation de PO et de Mix sans et avec EsO des fleurs et tiges de *P. scoparius* a constitué le second grand volet de la thèse. La composition en terpènes des deux huiles essentielles a influé le comportement de cristallisation des huiles étudiées. Il a été constaté que la cristallisation isotherme dans le Mix était plus lente que celle dans PO, probablement à cause de la composition tertiaire du Mix constitué de deux huiles fluides en plus de PO. Un retard de la cristallisation a été observé dans les échantillons avec EsO, appuyé par des enthalpies de fusion plus basses qui signifie des événements thermiques en faveur de la réorganisation cristalline. Des vitesses de cristallisation plus lentes ont été également constatées, avec des temps d'induction de la nucléation parfois très longs (cas du Mix). Un résultat plus frappant, celui de la diminution drastique des taux de solides (SFC) en présence des EsO même si les points de fusions des échantillons témoins et ceux avec EsO ne sont pas significativement différents ( $p > 0,05$ ). Ces résultats ont suggéré un effet des EsO sur la microstructure des corps gras. Cet effet se traduit par une morphologie cristalline différente pour certaines températures étudiées. Notre hypothèse de départ est que les composés majoritaires des terpènes engendrent probablement une modification de la cristallisation (cinétiques de cristallisation). Une perturbation probable des événements de nucléation et de croissance cristalline, un éventuel encombrement stérique par ces molécules et une orientation spatiale des TAGs affectée vraisemblablement par le mouvement des terpènes à l'intérieur de la structure cristalline sont des éléments de réponse plausibles à l'hypothèse émise.

Enfin, les résultats de cette thèse peuvent être complétés et confortés par des études plus approfondies par un ensemble de points, pouvant être résumés comme suit : *i*) une purification des antioxydants phénoliques par HPLC préparative et évaluation de l'activité antioxydante des différentes fractions, *ii*) adoption d'un procédé d'incorporation de ces fractions dans les émulsions par encapsulation des fractions purifiées ou par un procédé de microémulsification, *iii*) application d'un test d'oxydation se rapprochant des conditions réelles de stockage des corps gras, *iv*) étudier d'autres types d'émulsions O/W avec des mélanges antioxydants/EsO afin de mieux comprendre les interactions et le synergisme entre eux, *v*) suivre les interactions des protéine-polyphénols pendant des durées de stockages plus longues et déterminer la nature du polyphénol mis en jeu dans ces interactions, *vi*) l'étude de l'effet des EsO sur la cristallisation isotherme de PO et Mix mérite d'être étendue sur d'autres EsO et d'antioxydants phénoliques, pour essayer de dresser un portrait clair des mécanismes moléculaires pouvant sensiblement affecter la microstructure de matrices alimentaires telles que le chocolat et les shortenings.



# Références bibliographiques

- Abderrazak K., Messoued R. & Azzedine Z. Etude Phytochimique et de L'activité Antimicrobienne des Huiles Essentielles de Pituranthos Scoparius de la Region de Biskra (Sud-Est Algérien).
- Acevedo N.C. & Marangoni A.G. (2015) Nanostructured fat crystal systems. *Annual review of food science and technology* **6**, 71-96.
- Aćimović M.G., Kostadinović L.M., Popović S.J. & Dojčinović N.S. (2015) Apiaceae seeds as functional food. *Journal of Agricultural Sciences* **60**, 237-46.
- ADACHI S., MINTEN S. & KOBAYASHI T. (2009) Oxidation of lipid in bulk and dispersion systems. *Japan Journal of Food Engineering* **10**, 9-15.
- Adahchour M., Beens J., Vreuls R. & Brinkman U.T. (2006) Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC): I. Introduction and instrumental set-up. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **25**, 438-54.
- ADIDA H. Étude des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de Pituranthos scoparius Benth et Hook «Guezzah»: plante médicinale endémique du Sahara.
- Adida H., Benariba N., Bechiri A., Chekroun E. & Djaziri R. (2016) Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de Pituranthos scoparius. *Phytothérapie* **14**, 207-12.
- Adorjan B. & Buchbauer G. (2010) Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and fragrance journal* **25**, 407-26.
- Agregán R., Munekata P.E., Domínguez R., Carballo J., Franco D. & Lorenzo J.M. (2017) Proximate composition, phenolic content and in vitro antioxidant activity of aqueous extracts of the seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil under accelerated storage conditions. *Food Research International* **99**, 986-94.
- Aharoni A. & Galili G. (2011) Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Current opinion in biotechnology* **22**, 239-44.
- Ahmed W.K.A. & Hudson J.B. (1982) The fatty acid composition of Hibiscus sabdariffa seed oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **33**, 1305-9.
- Ahuja S. & Jespersen N. (2006) *Modern instrumental analysis*. Elsevier.
- Akaike T., Ijiri S., Sato K. & Maeda H. (1995) Determination of peroxy radical-scavenging activity in food by using bactericidal action of alkyl peroxy radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 1864-70.
- Akoh C.C. & Min D.B. (2002) Food lipids. *Chemistry. Nutrition. And Biotechnology*. Marcel Dekker. New York.
- Aladedunye F., Przybylski R. & Matthauss B. (2017) Performance of antioxidative compounds under frying conditions: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**, 1539-61.
- Ali B.H., Wabel N.A. & Blunden G. (2005) Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* **19**, 369-75.
- Aluyor E., Ozigagu C., Oboh O. & Aluyor P. (2009) Chromatographic analysis of vegetable oils: A review. *Scientific Research and Essay* **4**, 191-7.
- Apak R., Capanoglu E. & Shahidi F. (2017) *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*. John Wiley & Sons.
- Apel K. & Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-99.

- Aruoma O.I. (1996) Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **73**, 1617-25.
- Azmir J., Zaidul I., Rahman M., Sharif K., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M., Ghafoor K., Norulaini N. & Omar A. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering* **117**, 426-36.
- Balasundram N., Sundram K. & Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**, 191-203.
- Barba F.J., Esteve M.J. & Frígola A. (2014) Bioactive components from leaf vegetable products. In: *Studies in natural products chemistry* (pp. 321-46. Elsevier.
- Barclay L.R.C. & Ingold K. (1980) Autoxidation of a model membrane. A comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene. *Journal of the American Chemical Society* **102**, 7792-4.
- Bartle K.D. & Myers P. (2002) History of gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **21**, 547-57.
- BAUER M. (2005) Polymorphisme: Origine et méthodes d'étude. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*.
- Bauernfeind J.C. (1981) Carotenoids as colorants and vitamin A precursors; technological and nutritional applications.
- Baydar N.G., Özkan G. & Sağdıç O. (2004) Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control* **15**, 335-9.
- Bayes-Garcia L., Patel A.R., Dewettinck K., Rousseau D., Sato K. & Ueno S. (2015) Lipid crystallization kinetics—roles of external factors influencing functionality of end products. *Current Opinion in Food Science* **4**, 32-8.
- Beaulieu J.C. (2007) Effect of UV irradiation on cut cantaloupe: terpenoids and esters. *Journal of Food Science* **72**, S272-S81.
- Bedani F., Schoenmakers P.J. & Janssen H.G. (2012) Theories to support method development in comprehensive two-dimensional liquid chromatography—A review. *Journal of separation science* **35**, 1697-711.
- Bellakhdar J. (1997) La pharmacopée marocaine traditionnelle.
- Belyagoubi-Benhammou N., Belyagoubi L., Bechlaghem N., Ghembaza N. & Atik-Bekkara F. (2017) Assessment of antioxidant potential and phytochemical analysis of *Pituranthos scoparius* crude extract and its fractions. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* **17**, 51-7.
- Benalia H., Djeridane A., Bensafieddine F. & Yousfi M. (2016) High in vitro antiurolithiatic effect of *Pituranthos scoparius* roots extracts. *PhOL* **1**, 31-43.
- Benmekhbi L., Kabouche A., Kabouche Z., Ait-Kaki B., Touzani R. & Bruneau C. (2008) Five glycosylated flavonoids from the antibacterial butanolic extract of *Pituranthos scoparius*. *Chemistry of Natural Compounds* **44**, 639-41.
- Berton C., Ropers M.-H., Viau M. & Genot C. (2011) Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 5052-61.
- Bidie A., N'guessan B., Yapo A., N'guessan J. & Djaman A. (2013) Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature* **8**, 1-12.
- Biliaderis C.G. (1983) Differential scanning calorimetry in food research—a review. *Food Chemistry* **10**, 239-65.
- Black H.S. (2004) Mechanisms of pro-and antioxidation. *The Journal of nutrition* **134**, 3169S-70S.
- Blois M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199.

- Bohlmann J. & Keeling C.I. (2008) Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal* **54**, 656-69.
- Boland M., Singh H. & Thompson A. (2014) *Milk proteins: From expression to food*. Academic Press.
- Boudjelal A., HENCHIRI C., SARI M., SARRI D., HENDEL N., BENKHALED A. & RUBERTO G. (2013) Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *Journal of Ethnopharmacology* **148**, 395-402.
- Bousbia N. (2011) Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Université d'Avignon.
- Boutaghane N., Nacer A., Kabouche Z. & Ait-Kaki B. (2004) Comparative antibacterial activities of the essential Oils of stems and seeds of *Pituranthos scoparius* From algerian septentrional sahara. *Chemistry of Natural Compounds* **40**, 606-7.
- Brat P. (2001) Application du procédé de flash-détente (P) sous vide aux fruits tropicaux et méditerranéens pour la préparation de purées et huiles essentielles. Université de la Réunion.
- Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews* **56**, 317-33.
- Brisson G. (1982) *Lipides et nutrition humaine: analyse des données récentes sur les corps gras alimentaires*. Presses Université Laval.
- Brochette P. (1999) Emulsification: Elaboration et étude des émulsions. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés* **2**, J2150. 1-J. 22.
- BROWN E.J., Khodr H., HIDER C.R. & RICE-EVANS C.A. (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical journal* **330**, 1173-8.
- Buchbauer G. & Başer K.H.C. (2010) *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S., Bilić M. & Velić D. (2007) Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* **81**, 236-42.
- Buettner G.R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**, 535-43.
- Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology* **94**, 223-53.
- Burton G. & Ingold K. (1981) Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of the American Chemical Society* **103**, 6472-7.
- Cahuzac-Picaud M. (2010) Les huiles végétales, intérêt diététique et gastronomique. *Phytothérapie* **8**, 113-7.
- Calligaris S., Manzocco L. & Nicoli M.C. (2007) Modelling the temperature dependence of oxidation rate in water-in-oil emulsions stored at sub-zero temperatures. *Food Chemistry* **101**, 1019-24.
- Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P., Castillejos L. & Ferret A. (2007) Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science* **90**, 2580-95.
- Camelo-Méndez G., Ragazzo-Sánchez J., Jimenez-Aparicio A.R., Vanegas-Espinoza P.E., Paredes-López O. & Del Villar-Martinez A.A. (2013) Comparative study of anthocyanin and volatile compounds content of four varieties of Mexican roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) by multivariable analysis. *Plant Foods for Human Nutrition* **68**, 229-34.
- Campos R., Narine S. & Marangoni A. (2002) Effect of cooling rate on the structure and mechanical properties of milk fat and lard. *Food Research International* **35**, 971-81.

- Cansell M. (2005) Impact de la cristallisation des corps gras sur les propriétés des produits finis. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **12**, 427-31.
- Cao G., Sofic E. & Prior R.L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free radical biology and medicine* **22**, 749-60.
- Cardoso-Ugarte G.A., Juárez-Becerra G.P., SosaMorales M.E. & López-Malo A. (2013) Microwave-assisted extraction of essential oils from herbs. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy* **47**, 63-72.
- Carocho M. & Ferreira I.C. (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* **51**, 15-25.
- 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**, 859-71.
- Castilho P.C., do Céu Costa M., Rodrigues A., Branco P.C. & Costa M. (2004) Characterization of triacylglycerols in madeira laurel oil by HPLC-atmospheric pressure chemical ionization-MS. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **81**, 913-9.
- Ceconi C., Boraso A., Cargnoni A. & Ferrari R. (2003) Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **420**, 217-21.
- Cendres A. (2010) Procédé novateur d'extraction de jus de fruits par micro-onde: viabilité de fabrication et qualité nutritionnelle des jus. Université d'Avignon.
- Cert A., Moreda W. & Pérez-Camino M. (2000) Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *Journal of Chromatography A* **881**, 131-48.
- Chaleepa K., Szepes A. & Ulrich J. (2010) Effect of additives on isothermal crystallization kinetics and physical characteristics of coconut oil. *Chemistry and Physics of Lipids* **163**, 390-6.
- Chanforan C. (2010) Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation: études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Avignon.
- Chanphai P., Bourassa P., Kanakis C., Tarantilis P., Polissiou M. & Tajmir-Riahi H. (2018) Review on the loading efficacy of dietary tea polyphenols with milk proteins. *Food Hydrocolloids* **77**, 322-8.
- Charcosset C. (2009) Preparation of emulsions and particles by membrane emulsification for the food processing industry. *Journal of Food Engineering* **92**, 241-9.
- Cheftel J.-C., Cheftel H. & Becancon P. (1976) Introduction a la biochimie et a la technologie des aliments-v. 1-2.
- Chen C.C., Chou F.P., Ho Y.C., Lin W.L., Wang C.P., Kao E.S., Huang A.C. & Wang C.J. (2004) Inhibitory effects of Hibiscus sabdariffa L extract on low-density lipoprotein oxidation and anti-hyperlipidemia in fructose-fed and cholesterol-fed rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**, 1989-96.
- Chiavaro E. (2014) *Differential scanning calorimetry: applications in fat and oil technology*. CRC Press.
- Chotimarkorn C., Benjakul S. & Silalai N. (2008) Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. *Food Chemistry* **111**, 636-41.
- Chow C. & Draper H. (1970) Isolation of  $\gamma$ -tocotrienol dimers from Hevea latex. *Biochemistry* **9**, 445-50.

- Christova-Bagdassarian V., Bagdassarian K. & Atanassova M. (2013) Phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activities from the Apiaceae family (dry seeds). *Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences* **2**, 26-31.
- Chu B.S., Ghazali H.M., Lai O.M., Che Man Y.B. & Yusof S. (2002) Physical and chemical properties of a lipase-transesterified palm stearin/palm kernel olein blend and its isopropanol-solid and high melting triacylglycerol fractions. *Food Chemistry* **76**, 155-64.
- Cieśla Ł., Kryszewski J., Stochmal A., Oleszek W. & Waksmundzka-Hajnos M. (2012) Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **70**, 126-35.
- Cieśla Ł., Staszek D., Hajnos M., Kowalska T. & Waksmundzka-Hajnos M. (2011) Development of chromatographic and free radical scavenging activity fingerprints by thin-layer chromatography for selected *Salvia* species. *Phytochemical Analysis* **22**, 59-65.
- Cillard J. & Cillard P. (2006) Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **13**, 24-9.
- Cimpoi C. (2006) Analysis of Some Natural Antioxidants by Thin-Layer Chromatography and High Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of liquid chromatography & related technologies* **29**, 1125-42.
- Cisse M. (2010) Couplage de procédés membranaires pour la production d'extraits anthocyaniques: application à *Hibiscus sabdariffa*.
- Cisse M., Dornier M., Sakho M., MarDiop C., Reynes M. & Sock O. (2009) La production du bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) au Sénégal. *Fruits* **64**, 111-24.
- Connolly J. & Hill R. (1991) Dictionary of Terpenoids. Vol. 1: Mono- and Sesquiterpenoids, Vol. 2: Di and higher Terpenoids, Vol. 3: Indexes. New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall London.
- Cordero C., Rubiolo P., Cobelli L., Stani G., Miliazza A., Giardina M., Firor R. & Bicchi C. (2015) Potential of the reversed-inject differential flow modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography in the quantitative profiling and fingerprinting of essential oils of different complexity. *Journal of Chromatography A* **1417**, 79-95.
- Corrales M., García A.F., Butz P. & Tauscher B. (2009) Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* **90**, 415-21.
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J. & Berghe D.V. (1998) Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural products* **61**, 71-6.
- Coupland J.N. & McClements D.J. (1996) Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science & Technology* **7**, 83-91.
- Couteau D., McCartney A., Gibson G., Williamson G. & Faulds C. (2001) Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of applied microbiology* **90**, 873-81.
- Crozier A., Clifford M.N. & Ashihara H. (2008) *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons.
- Cuvelier C., Cabaraux J.-F., Dufresne I., Hornick J.-L. & Istasse L. (2004) Acides gras: nomenclature et sources alimentaires. In: *Annales de Médecine Vétérinaire*, pp. 133-40. Annales Medecine Veterinaire.

- Cuvelier M.-E., Richard H. & Berset C. (1992) Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **56**, 324-5.
- Czochanska Z., Foo L.Y. & Porter L.J. (1979) Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry* **18**, 1819-22.
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. & Masella R. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita* **43**, 348.
- Da-Costa-Rocha I., Bonnlaender B., Sievers H., Pischel I. & Heinrich M. (2014) Hibiscus sabdariffa L.—A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry* **165**, 424-43.
- Daayf F. & Lattanzio V. (2009) *Recent advances in polyphenol research*. John Wiley & Sons.
- Dallas F., Read H., Ruane R. & Wilson I. (1988) Recent advances in thin-layer chromatography.
- Dandlen S.A., Lima A.S., Mendes M.D., Miguel M.G., Faleiro M.L., Sousa M.J., Pedro L.G., Barroso J.G. & Figueiredo A.C. (2010) Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. *Flavour and fragrance journal* **25**, 150-5.
- Daniels D., King H. & Martin H. (1963) Antioxidants in oats: Esters of phenolic acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **14**, 385-90.
- Daniels D. & Martin H. (1967) Antioxidants in oats: Mono-esters of caffeic and ferulic acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **18**, 589-95.
- De Castro M.L. & Garcia-Ayuso L. (1998) Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* **369**, 1-10.
- de Freitas V. & Mateus N. (2012) Protein/polyphenol interactions: past and present contributions. Mechanisms of astringency perception. *Current Organic Chemistry* **16**, 724-46.
- De Godoy L.A.F., Hantao L.W., Pedroso M.P., Poppi R.J. & Augusto F. (2011) Quantitative analysis of essential oils in perfume using multivariate curve resolution combined with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* **699**, 120-5.
- De Graef V. (2009) *Microstructural properties of isothermal palm oil crystallization*. Ghent University.
- Decker E.A., Elias R.J. & McClements D.J. (2010) *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications: management in different industry sectors*. Elsevier.
- Degenhardt J., Köllner T.G. & Gershenzon J. (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **70**, 1621-37.
- del Baño M.J., Lorente J., Castillo J., Benavente-García O., del Río J.A., Ortuño A., Quirin K.-W. & Gerard D. (2003) Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4247-53.
- DellaPenna D. & Pogson B.J. (2006) Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 711-38.
- Delmas D., Lançon A., Colin D., Jannin B. & Latruffe N. (2006) Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Current drug targets* **7**, 423-42.
- Derkach S.R. (2009) Rheology of emulsions. *Advances in colloid and interface science* **151**, 1-23.

- Descamps-Latscha B., Drüeke T. & Witko-Sarsat V. (2001) Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. In: *Seminars in dialysis*, pp. 193-9. Wiley Online Library.
- Dewettinck K., Foubert I., Basiura M. & Goderis B. (2004) Phase behavior of cocoa butter in a two-step isothermal crystallization. *Crystal Growth & Design* **4**, 1295-302.
- Di Mattia C.D., Sacchetti G., Mastrocola D. & Pittia P. (2009) Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. *Food Research International* **42**, 1163-70.
- Di X., Shellie R.A., Marriott P.J. & Huie C.W. (2004) Application of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) for the chemical profiling of volatile oils in complex herbal mixtures. *Journal of separation science* **27**, 451-8.
- Dickinson E. (2010) Food emulsions and foams: stabilization by particles. *Current opinion in colloid & interface science* **15**, 40-9.
- Dimandja J.M.D., Stanfill S.B., Grainger J. & Patterson Jr D.G. (2000) Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) to the qualitative analysis of essential oils. *Journal of high resolution chromatography* **23**, 208-14.
- Djeridane A., Brunel J., Vidal N., Yousfi M., Ajandouz E. & Stocker P. (2008) Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavone glucoside isolated from *Deverra scoparia*. *Chemico-biological interactions* **172**, 22-6.
- Do T.-A., Vieira J., Hargreaves J., Wolf B. & Mitchell J. (2008) Impact of limonene on the physical properties of reduced fat chocolate. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **85**, 911-20.
- Dolde D.A. (2009) Oxidative stability of corn oil with elevated tocotrienols.
- Dubois V., Breton S., Linder M., Fanni J. & Parmentier M. (2008) Proposition de classement des sources végétales d'acides gras en fonction de leur profil nutritionnel. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **15**, 56-75.
- Ducasse M.-A. (2009) Impact des enzymes de macération sur la composition en polysaccharides et en polyphénols des vins rouges: étude de l'évolution de ces composés en solution modèle vin. Montpellier 2.
- Dudareva N., Pichersky E. & Gershenzon J. (2004) Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology* **135**, 1893-902.
- Dufour C. & Loonis M. (2007) Flavonoids and their oxidation products protect efficiently albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1770**, 958-65.
- Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M. & Sarek J. (2006) Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports* **23**, 394-411.
- Embuscado M. & Shahidi F. (2015) Handbook of antioxidants for food preservation. A volume in *Woodhead Publishing Series in Food Science*. UK: *Technology and Nutrition*, 251-83.
- Endo Y., Usuki R. & Kaneda T. (1985) Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **62**, 1387-90.
- Endrias A. (2006) Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'*Hibiscus sabdariffa* L. et à l'*Artemisia annua*.
- Engelmann M.D., Hutcheson R. & Cheng I.F. (2005) Stability of Ferric Complexes with 3-Hydroxyflavone (Flavonol), 5, 7-Dihydroxyflavone (Chrysin), and 3', 4'-Dihydroxyflavone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 2953-60.
- Eskin N.M. & Shahidi F. (2012) *Biochemistry of foods*. Academic Press.



- Ettre L. & Kolb B. (1996) Headspace—Gas Chromatography. *Headspace Analysis of Foods and Flavors: Theory and Practice*; Rouseff, RL, Cadwallader, KR, Eds, 9-32.
- Evans W.C. (2009) *Trease and Evans' Pharmacognosy E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Evrard J., Pagès-Xatart-Pares X., Argenson C. & Morin O. (2007) Procédés d'obtention et compositions nutritionnelles des huiles de tournesol, olive et colza. *Cahiers de Nutrition et de diététique* **42**, 13-23.
- Eymard S. (2003) Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*): choix des procédés. Université de Nantes.
- Fabricant D.S. & Farnsworth N.R. (2001) The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental health perspectives* **109**, 69.
- Favier A. (2003) Le stress oxydant. *L'actualité chimique* **108**.
- Feild T.S., Lee D.W. & Holbrook N.M. (2001) Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant physiology* **127**, 566-74.
- Fernandez M.E., Marin R.H., Luna A., Zunino M.P. & Labaque M.C. (2017) Thymol feed supplementation in quail alters the percentages of nutritionally relevant egg yolk fatty acids: effects throughout incubation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97**, 5233-40.
- Filippi J.-J., Belhassen E., Baldovini N., Brevard H. & Meierhenrich U.J. (2013) Qualitative and quantitative analysis of vetiver essential oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1288**, 127-48.
- Fine F., Vian M.A., Tixier A.-S.F., Carre P., Pages X. & Chemat F. (2013) Les agro-solvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses. *OCL* **20**, A502.
- Flickinger B.D. & Huth P.J. (2004) Dietary fats and oils: technologies for improving cardiovascular health. *Current atherosclerosis reports* **6**, 468-76.
- Forgacs E. & Cserhati T. (2002) Thin-layer chromatography of natural pigments: new advances. *Journal of liquid chromatography & related technologies* **25**, 1521-41.
- Foster R., Williamson C. & Lunn J. (2009) Briefing paper: Culinary oils and their health effects. *Nutrition Bulletin* **34**, 4-47.
- Foti M.C. & Ingold K. (2003) Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by  $\gamma$ -terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2758-65.
- Frankel E., German J., Kinsella J., Parks E. & Kanner J. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* **341**, 454-7.
- Frankel E.N. (1999) Food antioxidants and phytochemicals: present and future perspectives. *Lipid/Fett* **101**, 450-5.
- Frankel E.N., Huang S.-W., Kanner J. & German J.B. (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 1054-9.
- Fredrick E., Moens K., Heyman B., Fischer S., Van der Meeren P. & Dewettinck K. (2013) Monoacylglycerols in dairy recombined cream: I. The effect on milk fat crystallization. *Food Research International* **51**, 892-8.
- Friberg S., Larsson K. & Sjoblom J. (2003) *Food emulsions*. CRC Press.
- Fried B. & Sherma J. (1996) *Practical thin-layer chromatography: a multidisciplinary approach*. CRC Press.
- Fulcrand H., Mané C., Preys S., Mazerolles G., Bouchut C., Mazaauric J.-P., Souquet J.-M., Meudec E., Li Y. & Cole R.B. (2008) Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry* **69**, 3131-8.

- Garti N. & Satō K. (2001) *Crystallization processes in fats and lipid systems*. Marcel Dekker.
- Gatti M. (2012) Evaluation de l'effet du terroir sur la teneur en stilbènes du vin. Université d'Angers.
- Gershenzon J. & Dudareva N. (2007) The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology* **3**, 408.
- Ghotra B.S., Dyal S.D. & Narine S.S. (2002) Lipid shortenings: a review. *Food Research International* **35**, 1015-48.
- Ghrabi Z. (2005) A guide to medicinal plants in north Africa. *Malaga: IUCN Centre for Mediterranean Cooperation*.
- Gilani A., Jabeen Q., Ghayur M., Janbaz K. & Akhtar M. (2005) Studies on the antihypertensive, antispasmodic, bronchodilator and hepatoprotective activities of the *Carum copticum* seed extract. *Journal of Ethnopharmacology* **98**, 127-35.
- Gioielli L., Simões I. & Rodrigues J. (2003) Crystal morphology and interactions of binary and ternary mixtures of hydrogenated fats. *Journal of Food Engineering* **57**, 347-55.
- Giral P. & Moulin P. (2008) Les phytostérols: quelle utilisation en clinique pour abaisser le LDL-cholestérol? *Médecine des maladies Métaboliques* **2**, 373-7.
- Girotti-Chanu C. (2006) Étude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microtea debilis*. Lyon, INSA.
- Glavind J. & Holmer G. (1967) Thin-layer chromatographic determination of antioxidants by the stable free radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ -diphenyl-picrylhydrazyl. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **44**, 539-42.
- Glimn-Lacy J. & Kaufman P.B. (2006) *Botany illustrated: introduction to plants, major groups, flowering plant families*. Springer Science & Business Media.
- Gómez-Estaca J., López-de-Dicastillo C., Hernández-Muñoz P., Catalá R. & Gavara R. (2014) Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology* **35**, 42-51.
- Gonçalves R., Soares S., Mateus N. & De Freitas V. (2007) Inhibition of trypsin by condensed tannins and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 7596-601.
- Gonny M., Bradesi P. & Casanova J. (2004) Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *Flavour and fragrance journal* **19**, 424-33.
- Goodwin T.W. (1980) Biogeochemistry of Carotenoids. In: *The biochemistry of the carotenoids* (pp. 346-9. Springer.
- Gordon M. (1990) Principles and applications of gas chromatography in food analysis. *Ellis Horwood series in food science and technology (USA)*.
- Gorog S. (2018) *Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis: 0*. CRC press.
- Gould K., Davies K.M. & Winefield C. (2008) *Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications*. Springer Science & Business Media.
- Gould K.S. (2004) Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *BioMed research international* **2004**, 314-20.
- Goupy P., Dufour C., Loonis M. & Dangles O. (2003) Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 615-22.
- Greathead H. (2003) Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society* **62**, 279-90.
- Grigoraş C.-G. (2012) Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs. Université d'Orléans.
- Grotewold E. (2006) The science of flavonoids.

- Gu L., Kelm M.A., Hammerstone J.F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S. & Prior R.L. (2004) Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of nutrition* **134**, 613-7.
- Gu L., Zheng S., Wu T., Chou G. & Wang Z. (2014) High-performance thin-layer chromatographic-bioautographic method for the simultaneous determination of Magnolol and Honokiol in *Magnolia officinalis* cortex. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC* **27**, 5-10.
- Guinoiseau E. (2010) Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Université de Corse.
- Gunstone F.D. (2008) *Phospholipid technology and applications*. Oily Press.
- Gunstone F.D., Harwood J.L. & Dijkstra A.J. (2007) *The lipid handbook with CD-ROM*. CRC press.
- Gurr M.I. (1999) *Lipids in nutrition and health: a reappraisal*. Elsevier.
- Haenen G.R., Paquay J.B., Korthouwer R.E. & Bast A. (1997) Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **236**, 591-3.
- Hagerman A.E. (2002) Hydrolyzable tannin structural chemistry. *Tannin handbook*, 1-8.
- Hahn-Deinstrop E. (2007) *Applied thin-layer chromatography: best practice and avoidance of mistakes*. John Wiley & Sons.
- Hakkarainen R.J., Työppönen J.T., Hassan S., Bengtsson G., Jönsson S.L. & Lindberg P.O. (1984) Biopotency of vitamin E in barley. *British journal of nutrition* **52**, 335-49.
- Halliwell B. (2001) Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease. *Encyclopedia of Life Science*.
- Halliwell B. (1989) Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British journal of experimental pathology* **70**, 737.
- Halliwell B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine* **91**, S14-S22.
- Halliwell B. (1992) Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction? *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* **32**, S10-S5.
- Halliwell B. (2006a) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry* **97**, 1634-58.
- Halliwell B. (2006b) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* **141**, 312-22.
- Halliwell B. (2007) Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular research* **73**, 341-7.
- Halliwell B., Aeschbach R., Löliger J. & Aruoma O. (1995a) The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* **33**, 601-17.
- Halliwell B. & Gutteridge J. (1999) Free radicals, other reactive species and disease. *Free radicals in biology and medicine* **3**, 617-783.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M. (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **246**, 501-14.
- Halliwell B., Murcia M.A., Chirico S. & Aruoma O.I. (1995b) Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical reviews in food science & nutrition* **35**, 7-20.
- Hamada H., Mohammed B., Massiot G., Long C. & Lavaud C. (2004) Alkylated isocoumarins from *Pituranthos scoparius*. *Natural product research* **18**, 409-13.
- Hamilton R. & Bhati A. (1987) Recent advances in chemistry and technology of fats and oils.

- Hammiche V. & Maiza K. (2006) Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacology* **105**, 358-67.
- Hammoudi R., Dehak K., Mahammed M.H. & Ouldelhadj M.D. (2015) Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles de *Deverra scoparia* coss. & dur.(apiaceae). *Lebanese Science Journal* **16**, 27.
- HAMMOUDI R. & Mahfoud H.M. (2015) Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien.
- Hantao L.W., Najafi A., Zhang C., Augusto F. & Anderson J.L. (2014) Tuning the selectivity of ionic liquid stationary phases for enhanced separation of nonpolar analytes in kerosene using multidimensional gas chromatography. *Analytical Chemistry* **86**, 3717-21.
- Harborne J. (1984) Methods of plant analysis. In: *Phytochemical methods* (pp. 1-36. Springer.
- Harborne J.B. (1989) *Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics*. Academic Press Ltd.
- Hart K., Yanez-Ruiz D., Duval S., McEwan N. & Newbold C. (2008) Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* **147**, 8-35.
- Hartel R.W. (2013) Advances in food crystallization. *Annual review of food science and technology* **4**, 277-92.
- Hartmann T. (2007) From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**, 2831-46.
- Hashemi S.M.B., Khaneghah A.M. & de Souza Sant'Ana A. (2017a) *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*. John Wiley & Sons.
- Hashemi S.M.B., Khaneghah A.M., Ghahfarrokhi M.G. & Eş I. (2017b) Basil-seed gum containing *Origanum vulgare* subsp. *viride* essential oil as edible coating for fresh cut apricots. *Postharvest biology and technology* **125**, 26-34.
- Hashemi S.M.B., Khaneghah A.M., Koubaa M., Barba F.J., Abedi E., Niakousari M. & Tavakoli J. (2018) Extraction of essential oil from *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties. *Process Biochemistry* **65**, 197-204.
- Hashemi S.M.B., Nikmaram N., Esteghlal S., Khaneghah A.M., Niakousari M., Barba F.J., Roohinejad S. & Koubaa M. (2017c) Efficiency of ohmic assisted hydrodistillation for the extraction of essential oil from oregano (*Origanum vulgare* subsp. *viride*) spices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **41**, 172-8.
- Haslam E. (1977) Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry. *Phytochemistry* **16**, 1625-40.
- Hasni I., Bourassa P., Hamdani S., Samson G., Carpentier R. & Tajmir-Riahi H.-A. (2011) Interaction of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins with tea polyphenols. *Food Chemistry* **126**, 630-9.
- Hassan B.H. & Hobani A.I. (1998) Flow properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Journal of Food Engineering* **35**, 459-70.
- Hassanien M.M., Abdel-Razek A.G., Rudzińska M., Siger A., Ratusz K. & Przybylski R. (2014) Phytochemical contents and oxidative stability of oils from non-traditional sources. *European Journal of Lipid Science and Technology* **116**, 1563-71.
- Haton C. (2005) Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *Physiologie Physiopathologie*.
- Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M. & Hamdi M. (2007) The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry* **105**, 1126-34.
- Heftmann E. (2004) *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods: Fundamentals and Techniques*.

- Heim K.E., Tagliaferro A.R. & Bobilya D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* **13**, 572-84.
- Heleno S.A., Barros L., Sousa M.J., Martins A. & Ferreira I.C. (2010) Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry* **119**, 1443-50.
- Hennion M.-C., Cau-Dit-Coumes C. & Pichon V. (1998) Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples: tools for the rapid prediction and optimisation of the solid-phase extraction parameters. *Journal of Chromatography A* **823**, 147-61.
- Herrera M.L. (2012) *Analytical techniques for studying the physical properties of lipid emulsions*. Springer Science & Business Media.
- Herrera M.L., Falabella C., Melgarejo M. & Añón M.C. (1998) Isothermal crystallization of hydrogenated sunflower oil: I—Nucleation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **75**, 1273-80.
- Herrera M.L., Falabella C., Melgarejo M. & Añón M.C. (1999) Isothermal crystallization of hydrogenated sunflower oil: II. growth and solid fat content. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**, 1-6.
- Hertog M.G., Feskens E.J., Kromhout D., Hollman P. & Katan M. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet* **342**, 1007-11.
- Hidalgo F.J., León M.M. & Zamora R. (2006) Antioxidative activity of amino phospholipids and phospholipid/amino acid mixtures in edible oils as determined by the Rancimat method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 5461-7.
- Hofmann T., Glabasnia A., Schwarz B., Wisman K.N., Gangwer K.A. & Hagerman A.E. (2006) Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 9503-9.
- Holčapek M., Velínská H., Lída M. & Česla P. (2009) Orthogonality of silver-ion and non-aqueous reversed-phase HPLC/MS in the analysis of complex natural mixtures of triacylglycerols. *Journal of separation science* **32**, 3672-80.
- Holley R.A. & Patel D. (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* **22**, 273-92.
- Hu M. & Jacobsen C. (2016) *Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats*. Elsevier.
- Huber G.M., Rupasinghe H.V. & Shahidi F. (2009) Inhibition of oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acids and fish oil by quercetin glycosides. *Food Chemistry* **117**, 290-5.
- Hui Y.H. (2006) *Handbook of food science, technology, and engineering*. CRC press.
- Huie C.W. (2002) A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **373**, 23-30.
- Hussain S.A., Panjagari N.R., Singh R. & Patil G. (2015) Potential herbs and herbal nutraceuticals: food applications and their interactions with food components. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**, 94-122.
- Hussin M., Abdul-Hamid A., Mohamad S., Saari N., Ismail M. & Bejo M.H. (2007) Protective effect of Centella asiatica extract and powder on oxidative stress in rats. *Food Chemistry* **100**, 535-41.
- Hyldgaard M., Mygind T. & Meyer R.L. (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology* **3**, 12.

- 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**, 1821-35.
- Issaq H.J., Conrads T.P., Janini G.M. & Veenstra T.D. (2002) Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *Electrophoresis* **23**, 3048-61.
- Iversen C.K. (1999) Black currant nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. *Journal of Food Science* **64**, 37-41.
- Jacob C., Jamier V. & Ba L.A. (2011) Redox active secondary metabolites. *Current opinion in chemical biology* **15**, 149-55.
- Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. & Brulé G. (2008) Sciences des Aliments 1- Stabilisation biologique et physico-chimique. Tec & Doc Lavoisier.
- Jeyabalan J., Aqil F., Soper L., Schultz D.J. & Gupta R.C. (2015) Potent chemopreventive/antioxidant activity detected in common spices of the Apiaceae family. *Nutrition and cancer* **67**, 1201-7.
- Jöbstl E., Howse J.R., Fairclough J.P.A. & Williamson M.P. (2006) Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4077-81.
- Jork H. (1994) *Thin-layer chromatography: reagents and detection methods*. Wiley-VCH.
- Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H. & Burns D.T. (1990) Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I. Volume 1a: VCH, Weinheim, 1990 (ISBN 3-527-27834-6). xv+ 464 pp. Price DM 148.00. Elsevier.
- Julian D. & Clements M. (2004) *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kabouche A., Kabouche Z., Öztürk M., Kolak U. & Topçu G. (2007) Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. *Food Chemistry* **102**, 1281-7.
- Kaiserová H., Šimůnek T., Van Der Vijgh W.J., Bast A. & Kvasničková E. (2007) Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1772**, 1065-74.
- Kamal-Eldin A. & Appelqvist L.Å. (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**, 671-701.
- Kanakis C.D., Hasni I., Bourassa P., Tarantilis P.A., Polissiou M.G. & Tajmir-Riahi H.-A. (2011) Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry* **127**, 1046-55.
- Karabulut I. & Turan S. (2006) Some properties of margarines and shortenings marketed in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* **19**, 55-8.
- Karabulut I., Turan S. & Ergin G. (2004) Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. *European Food Research and Technology* **218**, 224-9.
- Kedare S.B. & Singh R. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* **48**, 412-22.
- Kimbaris A.C., Siatis N.G., Daferera D.J., Tarantilis P.A., Pappas C.S. & Polissiou M.G. (2006) Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochemistry* **13**, 54-60.
- Kinen M.M., Kamal-Eldin A., Lampi A.M. & Hopia A. (2000) Effects of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols on formation of hydroperoxides and two decomposition products from methyl linoleate. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **77**, 801-6.

- Kiokias S., Dimakou C., Tsaprouni I. & Oreopoulou V. (2006) Effect of Compositional Factors against the Thermal Oxidative Deterioration of Novel Food Emulsions. *Food Biophysics* **1**, 115-23.
- Kiokias S. & Varzakas T. (2014) Activity of flavonoids and  $\beta$ -carotene during the auto-oxidative deterioration of model food oil-in water emulsions. *Food Chemistry* **150**, 280-6.
- Kiokias S. & Varzakas T. (2017) Innovative applications of food-related emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**, 3165-72.
- Kliebenstein D.J. & Osbourn A. (2012) Making new molecules—evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current opinion in plant biology* **15**, 415-23.
- Kloskowski A., Chrzanowski W., Pilarczyk M. & Namiesnik J. (2007) Modern techniques of sample preparation for determination of organic analytes by gas chromatography. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **37**, 15-38.
- Knothe G. & Dunn R.O. (2009) A comprehensive evaluation of the melting points of fatty acids and esters determined by differential scanning calorimetry. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **86**, 843-56.
- Kochhar S. (1983) Influence of processing on sterols of edible vegetable oils. *Progress in Lipid Research* **22**, 161-88.
- Kodali D.R., Atkinson D., Redgrave T.G. & Small D.M. (1987) Structure and polymorphism of 18-carbon fatty acyl triacylglycerols: effect of unsaturation and substitution in the 2-position. *Journal of Lipid Research* **28**, 403-13.
- Kolb B. (1999) Headspace sampling with capillary columns. *Journal of Chromatography A* **842**, 163-205.
- Kolb B. & Ettre L.S. (2006) *Static headspace-gas chromatography: theory and practice*. John Wiley & Sons.
- Konczak I. & Zhang W. (2004) Anthocyanins—more than nature's colours. *BioMed research international* **2004**, 239-40.
- Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T.-F. & Brouillard R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**, 923-33.
- Kono Y., Kobayashi K., Tagawa S., Adachi K., Ueda A., Sawa Y. & Shibata H. (1997) Antioxidant activity of polyphenolics in diets: rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1335**, 335-42.
- Kritchevsky D. & Chen S.C. (2005) Phytosterols—health benefits and potential concerns: a review. *Nutrition Research* **25**, 413-28.
- Kropinski A.M., Kuzio J., Angus B.L. & Hancock R. (1982) Chemical and chromatographic analysis of lipopolysaccharide from an antibiotic-supersusceptible mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **21**, 310-9.
- Kroyer G.T. (2004) Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **5**, 101-5.
- Kroymann J. (2011) Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current opinion in plant biology* **14**, 246-51.
- Krupčík J., Gorovenko R., Špánik I., Armstrong D.W. & Sandra P. (2016) Enantioselective comprehensive two-dimensional gas chromatography of lavender essential oil. *Journal of separation science* **39**, 4765-72.
- Krupčík J., Gorovenko R., Špánik I., Sandra P. & Armstrong D.W. (2015) Enantioselective comprehensive two-dimensional gas chromatography. A route to elucidate the authenticity and origin of *Rosa damascena* Miller essential oils. *Journal of separation science* **38**, 3397-403.

- Ksouri A., Dob T., Belkebir A., Dahmane D. & Nouasri A. (2017) Volatile compounds and biological activities of aerial parts of *Pituranthos scoparius* (Coss and Dur) Schinz (Apiaceae) from Hoggar, southern Algeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **16**, 51-8.
- Kuorwel K.K., Cran M.J., Sonneveld K., Miltz J. & Bigger S.W. (2011) Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. *Journal of Food Science* **76**, R164-R77.
- Labuza T.P. & Dugan Jr L. (1971) Kinetics of lipid oxidation in foods. *Critical reviews in food science & nutrition* **2**, 355-405.
- Lagarda M., García-Llatas G. & Farré R. (2006) Analysis of phytosterols in foods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **41**, 1486-96.
- Laguette M., Lecomte J. & Villeneuve P. (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* **46**, 244-82.
- Lahlou M. (2004) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* **18**, 435-48.
- Lampi A.-M., Kataja L., Kamal-Eldin A. & Vieno P. (1999) Antioxidant activities of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols in the oxidation of rapeseed oil triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**, 749-55.
- Lang G. & Buchbauer G. (2012) A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and fragrance journal* **27**, 13-39.
- Lapornik B., Prošek M. & Wondra A.G. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* **71**, 214-22.
- Larsson K., Quinn P., Sato K. & Tiberg F. (2006) *Lipids: structure, physical properties and functionality*. Oily Press Bridgwater.
- Laura A., Alvarez-Parrilla E. & Gonzalez-Aguilar G.A. (2009) *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. John Wiley & Sons.
- Le Bourvellec C. & Renard C. (2012) Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **52**, 213-48.
- Leal-Calderon F., Schmitt V. & Bibette J. (2007) *Emulsion science: basic principles*. Springer Science & Business Media.
- Leatham G.F., King V. & Stahmann M.A. (1980) In vitro protein polymerization by quinones or free radicals generated by plant or fungal oxidative enzymes. *Phytopathology* **70**, 1134-40.
- Lecerf J.-M. (2011) Les huiles végétales: particularités et utilités: Vegetable oils: Particularities and usefulness. *Médecine des maladies Métaboliques* **5**, 257-62.
- Lee D.-S., Noh B.-S., Bae S.-Y. & Kim K. (1998) Characterization of fatty acids composition in vegetable oils by gas chromatography and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* **358**, 163-75.
- Lee D.W. (2002) Anthocyanins in autumn leaf senescence.
- Léger C.L. (2006) Anti-oxydants d'origine alimentaire: diversité, modes d'action anti-oxydante, interactions. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **13**, 59-69.
- Leong T.S.H., Manickam S., Martin G.J., Li W. & Ashokkumar M. (2018) *Ultrasonic Production of Nano-emulsions for Bioactive Delivery in Drug and Food Applications*. Springer.



- Liégeois C., Lermusieau G. & Collin S. (2000) Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 1129-34.
- Lillford P. & Aguilera J.M. (2007) *Food Materials Science: Principles and Practice*. Springer.
- Linskens H.F. & Jackson J. (1989) Modern methods of plant analysis. *Berlin, etc* **10**, 440-1.
- Lis-Balchin M., Deans S.G. & Eaglesham E. (1998) Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal* **13**, 98-104.
- Liu Q., Cai W. & Shao X. (2008) Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta* **77**, 679-83.
- Lograda T., Ramdani M., Kiram A., Chalard P. & Figueredo G. (2013) Variation of essential oils composition of *Pituranthos scoparius* in Algeria. *Global J Res. Med. Plants & Indigen. Med* **2**, 1-9.
- Lopez-Reyes J.G., Spadaro D., Prella A., Garibaldi A. & Gullino M.L. (2013) Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. *Journal of food protection* **76**, 631-9.
- Lorenzo J.M., Khaneghah A.M., Gavahian M., Marszałek K., Eş I., Munekata P.E., Ferreira I.C. & Barba F.J. (2018) Understanding the potential benefits of thyme and their derived products on food industry and health: From extraction of high-added value compounds to the evaluation of bioaccessibility, bioavailability, anti-inflammatory, and antimicrobial activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-52.
- LORIENT D. (1998) Modifications biochimiques des constituants alimentaires. *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire* **2**, F3400. 1-F. 21.
- Lucchesi M.-E. (2005) Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Université de la Réunion.
- Luck G., Liao H., Murray N.J., Grimmer H.R., Warminski E.E., Williamson M.P., Lilley T.H. & Haslam E. (1994) Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry* **37**, 357-71.
- Lundanes E., Reubsæet L. & Greibrokk T. (2013) *Chromatography: basic principles, sample preparations and related methods*. John Wiley & Sons.
- Maleky F. (2015) Nanostructuring triacylglycerol crystalline networks under external shear fields: a review. *Current Opinion in Food Science* **4**, 56-63.
- Malti C.E.W., Boussaïd M., Belyagoubi L., Paoli M., Gibernau M., Tomi F., Atik Bekkara F. & Bekhechi C. (2018) Chemical Variability of the Essential Oil Of *Pituranthos scoparius* from Algeria. *Chemistry & biodiversity*.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. & Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**, 727-47.
- Marangoni A.G., Acevedo N., Maleky F., Peyronel F., Mazzanti G., Quinn B. & Pink D. (2012) Structure and functionality of edible fats. *Soft Matter* **8**, 1275-300.
- Marangoni A.G. & Wesdorp L.H. (2012) *Structure and properties of fat crystal networks*. CRC Press.
- Marriott P.J., Shellie R. & Cornwell C. (2001) Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A* **936**, 1-22.
- Maruyama J.M., Soares F.A.S.D.M., D'Agostinho N.R., Gonçalves M.I.s.A., Gioielli L.A. & Da Silva R.C. (2014) Effects of emulsifier addition on the crystallization and melting behavior of palm olein and coconut oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 2253-63.

- Matile P. (2000) Biochemistry of Indian summer: physiology of autumnal leaf coloration. *Experimental gerontology* **35**, 145-58.
- Mazauric J.-P. & Salmon J.-M. (2005) Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 5647-53.
- Mazauric J.-P. & Salmon J.-M. (2006) Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: II. Analysis of desorbed polyphenol compounds from yeast lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 3876-81.
- Mc Clements D. (1999) Emulsion formation. In: *Food emulsions: principles, practice and techniques* (pp. 161-83. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- McClements D. & Decker E. (2000) Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science* **65**, 1270-82.
- McClements D.J. (2005) Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions. *Langmuir* **21**, 9777-85.
- McClements D.J. (2015) *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
- McClintock N. & El Tahir I. (2004) Hibiscus sabdariffa L. *PROTA* **2**.
- Medina K., Boido E., Dellacassa E. & Carrau F. (2005) Yeast interactions with anthocyanins during red wine fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* **56**, 104-9.
- Mendoza-Díaz S., del Carmen Ortiz-Valerio M., Castaño-Tostado E., de Dios Figueroa-Cárdenas J., Reynoso-Camacho R., Ramos-Gómez M., Campos-Vega R. & Loarca-Piña G. (2012) Antioxidant capacity and antimutagenic activity of anthocyanin and carotenoid extracts from nixtamalized pigmented creole maize races (*Zea mays* L.). *Plant Foods for Human Nutrition* **67**, 442-9.
- Merabtine Y. (2010) Etude des relations entre la structure des molécules odorantes et leurs équilibres rétention-libération entre phase vapeur et gels laitiers. Dijon.
- Merfort I. (2002) Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *Journal of Chromatography A* **967**, 115-30.
- Merrien A., Pouzet A., Krouti M., Dechambre J. & Garnon V. (2005) Contribution à l'étude de l'effet des températures basses sur la composition en acide gras de l'huile des akènes de tournesol (oléique et classique). *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **12**, 455-8.
- Miller D.M., Buettner G.R. & Aust S.D. (1990) Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free radical biology and medicine* **8**, 95-108.
- Min D. & Boff J. (2002) Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **1**, 58-72.
- Mira L., Tereza Fernandez M., Santos M., Rocha R., Helena Florêncio M. & Jennings K.R. (2002) Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free radical research* **36**, 1199-208.
- Miskandar M., Che Man Y., Abdul Rahman R., Nor Aini I. & Yusoff M. (2004) Palm oil crystallization: effects of cooling time and oil content. *Journal of Food Lipids* **11**, 190-207.
- Miura K., Kikuzaki H. & Nakatani N. (2002) Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1845-51.
- Miyasaki E.K., Santos C.A.d., Vieira L.R., Ming C.C., Calligaris G.A., Cardoso L.P. & Gonçalves L.A.G. (2015) Acceleration of polymorphic transition of cocoa butter and cocoa butter equivalent by addition of d-limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology*.

- Mondello L., Tranchida P.Q., Dugo P. & Dugo G. (2008) Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review. *Mass spectrometry reviews* **27**, 101-24.
- Monserrat J.-P. (2011) Synthèse, caractérisation et criblage biologique de nouveaux dérivés ferrocéniques des flavonoïdes: chalcones, aurones, flavones et flavonols. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Mora A., Paya M., Rios J. & Alcaraz M. (1990) Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology* **40**, 793-7.
- Morata A., Gómez-Cordovés M., Colomo B. & Suárez J. (2005) Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *European Food Research and Technology* **220**, 341-6.
- Morata A., Gómez-Cordovés M., Suberviola J., Bartolomé B., Colomo B. & Suárez J. (2003) Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4084-8.
- Moreau R.A., Whitaker B.D. & Hicks K.B. (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research* **41**, 457-500.
- Morello M.J., Shahidi F. & Ho C.-T. (2002) Free Radicals in Food: Chemistry. In: *Nutrition and Health Effects. ACS Symposium Series*.
- Muffler K., Leipold D., Scheller M.-C., Haas C., Steingroewer J., Bley T., Neuhaus H.E., Mirata M.A., Schrader J. & Ulber R. (2011) Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry* **46**, 1-15.
- Munné-Bosch S. & Alegre L. (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**, 31-57.
- Naczki M. & Shahidi F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **41**, 1523-42.
- Nagy K., Courtet-Compondu M.-C., Williamson G., Rezzi S., Kussmann M. & Rytz A. (2012) Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence. *Food Chemistry* **132**, 1333-9.
- Nardini M., Cirillo E., Natella F. & Scaccini C. (2002) Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5735-41.
- Narine S.S. & Marangoni A.G. (1999a) Fractal nature of fat crystal networks. *Physical Review E* **59**, 1908.
- Narine S.S. & Marangoni A.G. (1999b) Relating structure of fat crystal networks to mechanical properties: a review. *Food Research International* **32**, 227-48.
- Ncube B., Finnie J. & Van Staden J. (2012) Quality from the field: the impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South African Journal of Botany* **82**, 11-20.
- Neff W. & Byrdwell W. (1995) Soybean oil triacylglycerol analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **72**, 1185-91.
- Nenaah G.E. (2014) Chemical composition, toxicity and growth inhibitory activities of essential oils of three *Achillea* species and their nano-emulsions against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Industrial Crops and Products* **53**, 252-60.
- Ng W. & Oh C. (1994) A kinetic study on isothermal crystallization of palm oil by solid fat content measurements. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **71**, 1135-9.

- Nguyen D.T.T., Guillarme D., Rudaz S. & Veuthey J.L. (2006) Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *Journal of separation science* **29**, 1836-48.
- Nielsen S.S. (2010) *Food analysis*. Springer.
- Niggeweg R., Michael A.J. & Martin C. (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature biotechnology* **22**, 746-54.
- Nkhili E.-z. (2009) Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. *Diplôme de Doctorat. Université Cadi Ayyad-Marrakech*.
- Nordberg J. & Arner E.S. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1. *Free radical biology and medicine* **31**, 1287-312.
- Nováková L. & Vlčková H. (2009) A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* **656**, 8-35.
- Nyam K.-L., Leao S.-Y., Tan C.-P. & Long K. (2014) Functional properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed and its application as bakery product. *Journal of Food Science and Technology* **51**, 3830-7.
- O'brien R.D. (2008) *Fats and oils: formulating and processing for applications*. CRC press.
- Olech M., Komsta Ł., Nowak R., Cieśla Ł. & Waksmundzka-Hajnos M. (2012) Investigation of antiradical activity of plant material by thin-layer chromatography with image processing. *Food Chemistry* **132**, 549-53.
- Omais B., Courtiade M., Charon N., Ponthus J. & Thiébaud D. (2011) Considerations on orthogonality duality in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytical Chemistry* **83**, 7550-4.
- Omar J., Alonso I., Olivares M., Vallejo A. & Etxebarria N. (2012) Optimization of comprehensive two-dimensional gas-chromatography (GC× GC) mass spectrometry for the determination of essential oils. *Talanta* **88**, 145-51.
- Omar Z., Rashid N.A., Fauzi S.H.M., Shahrim Z. & Marangoni A.G. (2015) Fractal dimension in palm oil crystal networks during storage by image analysis and rheological measurements. *LWT-Food Science and Technology* **64**, 483-9.
- Ong R.C. & Marriott P.J. (2002) A review of basic concepts in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of chromatographic science* **40**, 276-91.
- Oprean R., Tamas M., Sandulescu R. & Roman L. (1998) Essential oils analysis. I. Evaluation of essential oils composition using both GC and MS fingerprints. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **18**, 651-7.
- Orhan İ.E., ÖZÇELİK B., Kartal M. & Kan Y. (2012) Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turkish Journal of Biology* **36**, 239-46.
- Oroojalian F., Kasra-Kermanshahi R., Azizi M. & Bassami M.R. (2010) Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry* **120**, 765-70.
- Ozenda P. (1991) *Flora and vegetation of the Sahara*. CNRS.
- Öztürk M. (2012) Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chemistry* **134**, 48-54.
- Pagès-Xatart-Parès X. (2008) Technologies des corps gras (huiles et graisses végétales). *Techniques de l'ingénieur, dossier F6070*, 19.
- Pages X., Morin O., Birot C., Gaud M., Fazeuilh S. & Gouband M. (2010) Raffinage des huiles et des corps gras et élimination des contaminants. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **17**, 86-99.

- Pani O. & Górecki T. (2006) Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) in environmental analysis and monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**, 1013-23.
- Pannala A.S., Chan T.S., O'Brien P.J. & Rice-Evans C.A. (2001) Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **282**, 1161-8.
- Paolini J. (2005) Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM (IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux Asteraceae endémiques de Corse: *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*. Université de Corse.
- Paré J. & Bélanger J.M. (1997) *Instrumental methods in food analysis*. Elsevier.
- Parmentier M., Guillemin S., Barbar R., Linder M. & Fanni J. (2004) De nouveaux procédés d'extraction des huiles pour des produits finis de haute qualité. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **11**, 377-80.
- Pascal C., Poncet-Legrand C.I., Cabane B. & Vernhet A. (2008) Aggregation of a proline-rich protein induced by epigallocatechin gallate and condensed tannins: effect of protein glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 6724-32.
- Pastre J. (2005) Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques.
- Patel A.R. & Dewettinck K. (2015) Current update on the influence of minor lipid components, shear and presence of interfaces on fat crystallization. *Current Opinion in Food Science* **3**, 65-70.
- Patra A.K. (2012) *Dietary phytochemicals and microbes*. Springer Science & Business Media.
- Patrushev Y. (2015) Advantages of two-dimensional gas chromatography. *Kinetics and Catalysis* **56**, 386-93.
- Paul H. (1995) "*Hibiscus sabdariffa*" L. Paris 5.
- Pelli K. & Lyly M. (2003) *Les antioxydants dans l'alimentation*. Institut national de la recherche agronomique.
- Penchev P.I. (2010) Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. INPT.
- Penton Z. (1992) Optimization of conditions in static headspace GC. *Journal of high resolution chromatography* **15**, 834-6.
- Peyrat-Maillard M., Cuvelier M.-E. & Berset C. (2003) Antioxidant activity of phenolic compounds in 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **80**, 1007.
- Pharmacopoeia V.-I. (2009) The department of health, social services and public safety. *British Pharmacopoeia Commission Office, London*, 1-5.
- PhD O.I.A. (1999) Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* **8**, 53-63.
- Phillips J.B. & Beens J. (1999) Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions. *Journal of Chromatography A* **856**, 331-47.
- Phillips J.B. & Xu J. (1995) Comprehensive multi-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **703**, 327-34.
- Phillips K.M., Ruggio D.M., Toivo J.I., Swank M.A. & Simpkins A.H. (2002) Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *Journal of Food Composition and Analysis* **15**, 123-42.
- Pietta P.-G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* **63**, 1035-42.

- Pinelo M., Rubilar M., Sineiro J. & Nunez M. (2004) Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry* **85**, 267-73.
- Plumb G.W., Garcia-Conesa M.T., Kroon P.A., Rhodes M., Ridley S. & Williamson G. (1999) Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 390-2.
- Poklar Ulrich N. (2017) Analytical techniques for the study of polyphenol–protein interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**, 2144-61.
- Ponginebbi L., Nawar W. & Chinachoti P. (1999) Oxidation of linoleic acid in emulsions: Effect of substrate, emulsifier, and sugar concentration. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**, 131.
- Poole S.K., Dean T.A., Oudsema J.W. & Poole C.F. (1990) Sample preparation for chromatographic separations: an overview. *Analytica Chimica Acta* **236**, 3-42.
- Porter W.L. (1993) Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicology and Industrial Health* **9**, 93-122.
- Pothier J., Galand N., El Ouali M. & Viel C. (2001) Comparison of planar chromatographic methods (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme. *Il Farmaco* **56**, 505-11.
- Pourmortazavi S.M. & Hajimirsadeghi S.S. (2007) Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A* **1163**, 2-24.
- Pozharitskaya O.N., Ivanova S.A., Shikov A.N. & Makarov V.G. (2007) Separation and evaluation of free radical-scavenging activity of phenol components of *Emblica officinalis* extract by using an HPTLC–DPPH• method. *Journal of separation science* **30**, 1250-4.
- Pratt D.E. & Hudson B.J. (1990) Natural antioxidants not exploited commercially. In: *Food antioxidants* (pp. 171-91). Springer.
- Preedy V.R. (2015) *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Academic Press.
- Prigent S.V., Gruppen H., Visser A.J., Van Koningsveld G.A., De Jong G.A. & Voragen A.G. (2003) Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 5088-95.
- Prigent S.V., Voragen A.G., Visser A.J., van Koningsveld G.A. & Gruppen H. (2007) Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**, 2502-10.
- Quézel P. & Santa S. (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C. & Pouysegu L. (2011) Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 586-621.
- Quilez J., Garcia-Lorda P. & Salas-Salvado J. (2003) Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clinical Nutrition* **22**, 343-51.
- Qureshi A.A., Sami S.A., Salser W.A. & Khan F.A. (2001) Synergistic effect of tocotrienol-rich fraction (TRF25) of rice bran and lovastatin on lipid parameters in hypercholesterolemic humans. *The Journal of nutritional biochemistry* **12**, 318-29.
- Ramarathnam N., Osawa T., Ochi H. & Kawakishi S. (1995) The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science & Technology* **6**, 75-82.
- Ray J., MacNaughtan W., Chong P.S., Vieira J. & Wolf B. (2012) The effect of limonene on the crystallization of cocoa butter. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **89**, 437-45.

- Ré D., Nafia I., Nieoullon A., Le Goff L.K. & Had-Aissouni L. (2005) Stress oxydatif cérébral: les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate? Implications sur la survie neuronale. In: *Annales francaises d'anesthésie et de réanimation*, pp. 502-9. Elsevier.
- Reddy L.H. & Couvreur P. (2009) Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 1412-26.
- RELKIN P. (2006) Microcalorimétrie à balayage DSC: Application agroalimentaire. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*.
- Ribeiro M., Bernardo-Gil M. & Esquivel M. (2001) Melissa officinalis, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. *The Journal of Supercritical Fluids* **21**, 51-60.
- Rice-Evans C., Miller N. & Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* **2**, 152-9.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. & Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine* **20**, 933-56.
- Rigolle A., Foubert I., Hettler J., Verboven E., Martens A., Demuynck R. & Van Den Abeele K. (2016a) Insight in ultrasonic shear reflection parameters by studying temperature and limonene influence on cocoa butter crystallization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **33**, 289-97.
- Rigolle A., Gheysen L., Depypere F., Landuyt A., Van Den Abeele K. & Foubert I. (2015) Lecithin influences cocoa butter crystallization depending on concentration and matrix. *European Journal of Lipid Science and Technology* **117**, 1722-32.
- Rigolle A., Goderis B., Van Den Abeele K. & Foubert I. (2016b) Isothermal Crystallization Behavior of Cocoa Butter at 17 and 20° C with and without Limonene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 3405-16.
- Rincón-Cardona J.A., Agudelo-Laverde L.M., Martini S., Candal R.J. & Herrera M.L. (2014) In situ synchrotron radiation X-ray scattering study on the effect of a stearic sucrose ester on polymorphic behavior of a new sunflower oil variety. *Food Research International* **64**, 9-17.
- Ringuette S. (2001) *Etudes des triglycerides et de leurs melanges par calorimetrie et diffraction des rayons X*. Université Laval.
- Robards K. (2003) Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* **1000**, 657-91.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P. & Glover W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**, 401-36.
- Robbins R.J. (2003) Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2866-87.
- Rodriguez-Amaya D.B. (2001) *A guide to carotenoid analysis in foods*. ILSI press Washington.
- Rodriguez-Amaya D.B. (2015) *Food carotenoids: chemistry, biology and technology*. John Wiley & Sons.
- Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M., Godoy H.T. & Amaya-Farfan J. (2008) Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis* **21**, 445-63.
- Roginsky V. & Lissi E.A. (2005) Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* **92**, 235-54.
- Rolland Y. (2004) Antioxydants naturels végétaux. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **11**, 419-24.
- Roman O. (2012) Mesure et prédiction de la réactivité des lipides au cours du chauffage d'huiles végétales à haute température. AgroParisTech.

- Rouessac F., Rouessac A. & Cruché D. (2004) *Analyse chimique-6e éd.: Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod.
- Rouseff R.L. & Cadwallader K.R. (2001) *Headspace Analysis of Foods and Flavors: Theory and Practice; [proceedings of the American Chemical Society, Held August 23-27, 1998, in Boston, Massachusetts]*. Springer Science & Business Media.
- Saadi S., Ariffin A.A., Ghazali H.M., Miskandar M.S., Abdulkarim S.M. & Boo H.C. (2011) Effect of Blending and Emulsification on Thermal Behavior, Solid Fat Content, and Microstructure Properties of Palm Oil-Based Margarine Fats. *Journal of Food Science* **76**, C21-C30.
- Sahebkar A. & Iranshahi M. (2011) Volatile constituents of the genus *Ferula* (Apiaceae): A review. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **14**, 504-31.
- Salas J.J., Bootello M.A., Martínez-Force E. & Garcés R. (2009) Tropical vegetable fats and butters: properties and new alternatives. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **16**, 254-8.
- Saleem F. (2010) Anti-diabetic potentials of phenolic enriched Chilean potato and select herbs of Apiaceae and Lamiaceae Families.
- Saleem M., Kim H.J., Ali M.S. & Lee Y.S. (2005) An update on bioactive plant lignans. *Natural Product Reports* **22**, 696-716.
- Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibanez E., Senorans F. & Reglero G. (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of food protection* **68**, 790-5.
- Sasidharan S., Chen Y., Saravanan D., Sundram K. & Latha L.Y. (2011) Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* **8**.
- Sato K. (2001) Crystallization behaviour of fats and lipids—a review. *Chemical Engineering Science* **56**, 2255-65.
- SATO K., GoDA Y., YOSHIHIRA K. & NOGUCHI H. (1991) Structure and contents of main coloring constituents in the calyces of *Hibiscus sabdariffa* and commercial roselle color. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)* **32**, 301-7\_1.
- Sato K. & Ueno S. (2011) Crystallization, transformation and microstructures of polymorphic fats in colloidal dispersion states. *Current opinion in colloid & interface science* **16**, 384-90.
- Sato Y., Itagaki S., Kurokawa T., Ogura J., Kobayashi M., Hirano T., Sugawara M. & Iseki K. (2011) In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics* **403**, 136-8.
- Sawa T., Nakao M., Akaike T., Ono K. & Maeda H. (1999) Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 397-402.
- Sáyago-Ayerdi S.G., Arranz S., Serrano J. & Goñi I. (2007) Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *J. of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 7886-90.
- Scalbert A., Morand C., Manach C. & Rémésy C. (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **56**, 276-82.
- Schibli A. & Rich E. (2007) *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. Thieme Medicinal Publishers, Inc., New York.
- Schmidt B.M., Howell A.B., McEniry B., Knight C.T., Seigler D., Erdman J.W. & Lila M.A. (2004) Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components



- from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 6433-42.
- Schwartzberg H.G. (1997) Expression of fluid from biological solids. *Separation and Purification Methods* **26**, 1-213.
- Scott R.P. (2003) Principles and practice of chromatography. *Chrom-Ed Book Series* **1**.
- Seeley J.V., Seeley S.K., Libby E.K., Breitbach Z.S. & Armstrong D.W. (2008) Comprehensive two-dimensional gas chromatography using a high-temperature phosphonium ionic liquid column. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**, 323-32.
- Seeram N.P. & Nair M.G. (2002) Inhibition of lipid peroxidation and structure–activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5308-12.
- Séjourné C. (2009) Mécanismes d’actions des phytostérols au niveau intestinal. *Cahiers de Nutrition et de diététique* **44**, 132-5.
- Seppanen C., Song Q. & Saari Csallany A. (2010) The Antioxidant Functions of Tocopherol and Tocotrienol Homologues in Oils, Fats, and Food Systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **87**, 469-81.
- Severac E. (2010) Valorisation enzymatique des huiles végétales. INSA de Toulouse.
- Seyoum A., Asres K. & El-Fiky F.K. (2006) Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* **67**, 2058-70.
- Shahidi F. (2005a) *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6 Volume Set*. Chapter.
- Shahidi F. (2005b) *Bailey's industrial oil and fat products: Volume 1, Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects*. Hoboken. NJ: Wiley-Interscience.
- Shashkov M. & Sidelnikov V. (2013) Properties of columns with several pyridinium and imidazolium ionic liquid stationary phases. *Journal of Chromatography A* **1309**, 56-63.
- Shellie R., Mondello L., Marriott P. & Dugo G. (2002) Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography–mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **970**, 225-34.
- Sherma J. (1998) Planar chromatography. *Analytical Chemistry* **70**, 7-26.
- Sherma J. & Fried B. (2003) *Handbook of thin-layer chromatography*. CRC press.
- Shimamura K., Ueno S., Miyamoto Y. & Sato K. (2013) Effects of polyglycerine fatty acid esters having different fatty acid moieties on crystallization of palm stearin. *Crystal Growth & Design* **13**, 4746-54.
- Simonovska B., Vovk I., Andrenšek S., Valentová K. & Ulrichová J. (2003) Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A* **1016**, 89-98.
- SIRET C. (2004) Structure des aliments. *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire* **1**, F1012. 1-F. 21.
- Smith K.W., Bhaggan K., Talbot G. & van Malssen K.F. (2011) Crystallization of Fats: Influence of Minor Components and Additives. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **88**, 1085-101.
- Smith R.M. (2003) Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A* **1000**, 3-27.
- Sonwa M.M. (2000) Isolation and Structure elucidation of essential oil constituents. *Dr. rer. nat. degree, Department of Organic chemistry, University of Hamburg*.
- Spangenberg B., Poole C.F. & Weins C. (2011) *Quantitative thin-layer chromatography: a practical survey*. Springer Science & Business Media.

- Srivastava M. (2010) *High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)*. Springer Science & Business Media.
- St Angelo A.J. (1992) Lipid oxidation in food. In: *ACS symposium series (USA)*. American Chemical Society.
- St. Angelo A.J., Vercellotti J., Jacks T. & Legendre M. (1996) Lipid oxidation in foods. *Critical reviews in food science & nutrition* **36**, 175-224.
- Stahl W. & Sies H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* **24**, 345-51.
- Stahl W. & Sies H. (2005) Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **1740**, 101-7.
- Stintzing F.C. & Carle R. (2004) Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 19-38.
- Strati I. & Oreopoulou V. (2014) Recovery of carotenoids from tomato processing by-products—a review. *Food Research International* **65**, 311-21.
- Sun Y.-E., Wang W.-D., Chen H.-W. & Li C. (2011) Autoxidation of unsaturated lipids in food emulsion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51**, 453-66.
- Svoboda K.P., Svoboda T.G. & Syred A. (2000) Secretory structures of aromatic and medicinal plants. *Powys, UK, Microscopix*.
- Swain T. & Hillis W. (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **10**, 63-8.
- Swank R. & Munkres K. (1971) Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Analytical biochemistry* **39**, 462-77.
- Tamagnone L., Merida A., Stacey N., Plaskitt K., Parr A., Chang C.-F., Lynn D., Dow J.M., Roberts K. & Martin C. (1998) Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *The Plant Cell* **10**, 1801-16.
- Tangara M.S. (2012) Essais sur un Médicament Traditionnel Amélioré à base des calices de *Hibiscus sabdariffa* utilisé contre l'hypertension artérielle: formulation et dénomination commerciale. Thèse de pharmacie, USST de Bamako, Bamako.
- Temsamani H. (2015) Etude des effets neuroprotecteurs des stilbènes de la vigne sur la maladie de Parkinson. Université de Bordeaux.
- Thivilliers F. (2007) Gels d'émulsions à base d'huiles cristallisables: mécanismes de formation et propriétés rhéologiques. Université Sciences et Technologies-Bordeaux I.
- Thormar H. (2010) *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. John Wiley & Sons.
- Timms R. (1984) Phase behaviour of fats and their mixtures. *Progress in Lipid Research* **23**, 1-38.
- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P. & Cullen P. (2009) Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 5987-6000.
- Toor R.K., Savage G.P. & Heeb A. (2006) Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis* **19**, 20-7.
- Tsai P.-J., McIntosh J., Pearce P., Camden B. & Jordan B.R. (2002) Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International* **35**, 351-6.
- TAI P.J., HUANG H.P. & HUANG T.C. (2004) Relationship between anthocyanin patterns and antioxidant capacity in mulberry wine during storage. *Journal of food quality* **27**, 497-505.

- Tsao R. & Yang R. (2003) Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1018**, 29-40.
- Tseng T.-H., Kao E.-S., Chu C.-Y., Chou F.-P., Wu H.-W.L. & Wang C.-J. (1997) Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* **35**, 1159-64.
- Tsimogiannis D. & Oreopoulou V. (2004) Free radical scavenging and antioxidant activity of 5, 7, 3', 4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **5**, 523-8.
- Turek C. & Stintzing F.C. (2013) Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**, 40-53.
- Tzia C. & Liadakis G. (2003) *Extraction optimization in food engineering*. CRC Press.
- Ueno S., Minato A., Yano J. & Sato K. (1999) Synchrotron radiation X-ray diffraction study of polymorphic crystallization of SOS from liquid phase. *Journal of Crystal Growth* **198**, 1326-9.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M. & Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 44-84.
- Van Acker S.A., Tromp M.N., Griffioen D.H., Van Bennekom W.P., Van Der Vijgh W.J. & Bast A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free radical biology and medicine* **20**, 331-42.
- Van Holde K.E., Johnson W.C. & Ho P.S. (2006) Principles of physical biochemistry.
- Vasconsuelo A. & Boland R. (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* **172**, 861-75.
- Vérité P., Nacer A., Kabouche Z. & Seguin E. (2004) Composition of seeds and stems essential oils of *Pituranthos scoparius* (Coss. & Dur.) Schinz. *Flavour and fragrance journal* **19**, 562-4.
- Vernin G., Lageot C., Ghiglione C., Dahia M. & Parkanyi C. (1999) GC/MS Analysis of the Volatile Constituents of the Essential Oils of *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur.) Benth. et Hook, from Algeria. *Journal of Essential Oil Research* **11**, 673-6.
- Verstringe S., Danthine S., Blecker C., Depypere F. & Dewettinck K. (2013) Influence of monopalmitin on the isothermal crystallization mechanism of palm oil. *Food Research International* **51**, 344-53.
- Verstringe S., Danthine S., Blecker C. & Dewettinck K. (2014) Influence of a commercial monoacylglycerol on the crystallization mechanism of palm oil as compared to its pure constituents. *Food Research International* **62**, 694-700.
- Villière A. & Genot C. (2006) Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides en émulsions. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **13**, 152-9.
- Vinatoru M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* **8**, 303-13.
- Wagner H. & Bladt S. (1996) *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.
- Waksmundzka-Hajnos M., Kowalska T. & Sherma J. (2008) *Thin layer chromatography in phytochemistry*. CRC Press.
- Wang J., Cao X., Qi Y., Ferchaud V., Chin K.L. & Tang F. (2015) High-Performance Thin-Layer Chromatographic Method for Screening Antioxidant Compounds and Discrimination of *Hibiscus sabdariffa* L. by Principal Component Analysis. *Journal of Planar Chromatography* **28**, 274-9.
- Wang M., Avula B., Wang Y.-H., Zhao J., Avonto C., Parcher J.F., Raman V., Zweigenbaum J.A., Wylie P.L. & Khan I.A. (2014) An integrated approach utilising chemometrics

- and GC/MS for classification of chamomile flowers, essential oils and commercial products. *Food Chemistry* **152**, 391-8.
- Wang T., Hicks K.B. & Moreau R. (2002) Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **79**, 1201-6.
- Waraho T., McClements D.J. & Decker E.A. (2011) Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science & Technology* **22**, 3-13.
- Weselake R.J. (2007) *Teaching innovations in lipid science*. CRC Press.
- Wheatley R.A. (2000) Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **19**, 617-28.
- Williamson G., Day A., Plumb G. & Couteau D. (2000) Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. Portland Press Limited.
- Williamson M.P. (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochemical journal* **297**, 249.
- Wink M. (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**, 3-19.
- Wixom R.L. & Gehrke C.W. (2011) *Chromatography: a science of discovery*. John Wiley & Sons.
- Wojtunik K.A., Ciesla L.M. & Waksmundzka-Hajnos M. (2014) Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 9088-94.
- Wozniak D., Janda B., Kapusta I., Oleszek W. & Matkowski A. (2010) Antimutagenic and anti-oxidant activities of isoflavonoids from *Belamcanda chinensis* (L.) DC. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **696**, 148-53.
- Wu N. & Clausen A.M. (2007) Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. *Journal of separation science* **30**, 1167-82.
- Xu Z. & Godber J.S. (2001) Antioxidant activities of major components of  $\gamma$ -oryzanol from rice bran using a linoleic acid model. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **78**, 645.
- Yamauchi R., Kato K. & Ueno Y. (1995) Free-radical scavenging reactions of  $\alpha$ -tocopherol during the autoxidation of methyl linoleate in bulk phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 1455-61.
- Yanishlieva N.V., Kamal-Eldin A., Marinova E.M. & Toneva A.G. (2002) Kinetics of antioxidant action of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols in sunflower and soybean triacylglycerols. *European Journal of Lipid Science and Technology* **104**, 262-70.
- Yoshida Y. & Niki E. (2003) Antioxidant effects of phytosterol and its components. *Journal of nutritional science and vitaminology* **49**, 277-80.
- Yrjönen T., Peiwu L., Summanen J., Hopia A. & Vuorela H. (2003) Free radical-scavenging activity of phenolics by reversed-phase TLC. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **80**, 9.
- Zeb A. & Murkovic M. (2010) Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS. *European Journal of Lipid Science and Technology* **112**, 844-51.
- Zhang L., Ueno S., Miura S. & Sato K. (2007) Binary phase behavior of 1, 3-dipalmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol and 1, 2-dioleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **84**, 219-27.
- Zhang L., Ueno S., Sato K., Adlof R. & List G. (2009) Thermal and structural properties of binary mixtures of 1, 3-distearoyl-2-oleoyl-glycerol (SOS) and 1, 2-dioleoyl-3-stearoyl-sn-glycerol (sn-OOS). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **98**, 105-11.

- Zhou Y. & Hartel R.W. (2006) Phase behavior of model lipid systems: solubility of high-melting fats in low-melting fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **83**, 505-11.
- Zlatkis A. & Kaiser R.E. (2011) *HPTLC-high performance thin-layer chromatography*. Elsevier.
- Zoccali M., Tranchida P.Q., Bonaccorsi I.L., Dugo P., Mondello L. & Dugo G. (2017) Detailed profiling of the volatile oxygenated fraction of mandarin essential oils by using the off-line combination of high-performance liquid chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Food Analytical Methods* **10**, 1106-16.

Liste des  
communications et  
publications  
internationales

## Liste des communications et publications internationales

### Communications scientifiques

1. Anis **CHIKHOUNE** et Mitja **KRIŽMAN**. (2014). **Qualitative and quantitative analysis of volatile components in Pituranthos scoparius by GC-MS and MHE-GC-FID**. Participation at the 38th International Symposium On Capillary Chromatography and the 11th GCXGC Symposium. Riva del Garda FiereCongressi, Riva del Garda, Italy.
2. Anis **CHIKHOUNE**, Abdelghani **BOUDJELLAL** and Silvana **MARTINI**. 2016. **Essential Oil of Pituranthos scoparius Delays Crystallization in Palm Oil**. Food & Candy Exposition, Salt Lake City, April 7th (Poster Presentation).
3. Anis **CHIKHOUNE**, Abdelghani **BOUDJELLAL** and Silvana **MARTINI**. 2016. **Essential Oil of Pituranthos scoparius Delays Crystallization in Palm Oil**. 107th AOCS Annual Meeting and Expo, Salt Lake City, UT, May 1-4th (Poster Presentation).
4. Anis **CHIKHOUNE**, Jan Damjan **PAVLECA**, Mikhail **SHASHKOV**, Zahra **BERROUA**, Kaissa **CHEBBI**, Hind **BOUGUERRA**, Brahim **ZEROUAL**, Khellaf **ALIANE**, Abdelghani **BOUDJELLAL**, Irena **VOVK** and Mitja **KRIŽMAN**. 2016. **Potential Use and Exploitation of Pituranthos scoparius as a Biopreservative**. 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants, Coimbra, Portugal, May 29th to June 1st (Poster Presentation).
5. Anis **CHIKHOUNE**, Mikhail **SHASHKOV**, Abdelghani **BOUDJELLAL** and Silvana **MARTINI**. 2017. **Terpenes from Flowers and Stems of Pituranthos scoparius' Essential Oil**. 23rd International Symposium on Separation Sciences, Vienna, Austria. September 19th to 22nd (Poster Presentation).

### Publications scientifiques

1. **Chikhouné A.**, Pavlica J.D., Shashkov M., Berroua Z., Chebbi K., Bougherra H., Zeroual B., Aliane K., Gagaoua M., Boudjellal A., Vovk I. et Križman M. **Antioxidant effect induced by the essential oil of Pituranthos scoparius in a formulation of a whey spread emulsion**. Journal of Food Processing and Preservation (2017) e13163, 1 – 12.
2. **Chikhouné A.**, Gagaoua M., Nanema K.D., Souleymane A.S., HAFID K., Aliane K., Hadjal S., Madani K., Sentandreu E., Sentandreu M.A, Boudjellal A., Križman M. et Vovk I. **Antioxidant Activity of Hibiscus sabdariffa Extracts Incorporated in an Emulsion System**

**Containing Whey Proteins: Oxidative Stability and Polyphenol-Whey Proteins Interactions.** *Arabian Journal for Science and Engineering* (2017) 42: 2247 - 2260.

**3. Chikhoun A.,** Križman M., Pavlica J.D., Shashkov M., Berroua Z., Chebbi K., Zeroual B., Aliane K., Hadjal S., Tounsi A., Boudjellal A. et Gagaoua M. **Aqueous extract of *Pituranthos scoparius* as a biopreservative against lipid oxidation of an emulsion and use of SDS-PAGE to asses protein-polyphenols interactions.** *Journal of Integrative Food, Nutrition and Metabolism* (2018) 5 (4): 1 – 6.

**4. Chikhoun A.,** Shashkov M., Piligaev A.V., Lee J., Boudjellal A. et Martini S. **Addition of Essential Oils to Palm oil-based Fats: Effect on Isothermal Crystallization.** Soumis pour publication dans *Food Chemistry* (2018) xx (xx) : xxxx – xxxx.



## ملخص

مضادات الأكسدة لها تأثير كبير اليوم على مستوى الصحة البشرية و على المستوى التكنولوجي. هذه الأطروحة تسلط الضوء على تأثير هذه المواد المضادة للأكسدة على الاستقرار التأكسدي لمستحلب أصل اللبن من نوع spread ، و أيضا على تبلور دهون الزيوت النباتية المشكلة لجزءها الدهني. تمت دراسة المستخلصات الفينولية الخام لـ *Pituranthos scoparius* و *Hibiscus sabdariffa* و الزيوت الأساسية للجزء الخضري لـ *P. scoparius*.. تم الحصول على هذه المستخلصات من خلال تقنيات الاستخراج التقليدية (الاستخلاص بالجلي و التقطير المائي) وتقنيات غير تقليدية (الميكروويف والموجات فوق الصوتية). أجريت اختبارات الطيف الضوئي لحساب محتوى المستخلصات الخام التي تمت دراستها من المركبات الفينولية.. عدة تقنيات كروماتوغرافية مختلفة تم استخدامها لدراسة خصائص وتحديد أنواع مختلفة من مضادات الأكسدة.. تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة من خلال اختبارات الطاقة الاختزالية والنشاط المضاد.. تمت تركيب مستحلبات مختلفة على مستوى المختبر والمجرب التجريبي ، مدمجة بمستخلصات الفينول الخام للنبتين ، و الزيت الأساسي لساق *P scoparius* بتركيز تتراوح ما بين 100 إلى 900 جزء في المليون.. تم تقييم استقرارها التأكسدي من خلال اختبار Rancimat. جزئي المستحلب المدروسين تم تناولهم بنوعين من الدراسات: تفاعلات البروتين البوليفينول في الجزء المائي و تبلور الدهون في الجزء الدهني المكون من الزيوت النباتية للنخيل و الصويا و عباد الشمس.. تم استخدام Tricine SDS-PAGE في الدراسة الأولى ومجموعة من تقنيات الفحص للبلورة متساوية الحرارة (DCS- و p-NMR و PLM ) . نتائج الاختبارات الطيفية، الكروماتوغرافية والنشاط المضادة للأكسدة تتطابق مع نتائج الاستقرار التأكسدي وتظهر تأثير وقائي ضد أكسدة الدهون بتركيز منخفضة من المستخلصات الفينولية الخام لكلا النباتين (100 و 300 جزء في المليون) و الزيت الأساسي لـ *scoparius P* (100 جزء في المليون). أوضح التقييم الحسي المضاف للـ spread ب 100 و 300 و 600 جزء في المليون من الزيت الأساسي لـ *P. scoparius* ، مع التحليل الإحصائي المكون الأساسي (ACP) تأثير بعض الصفات الحسية على فصل المستحلبات. عند هذه التراكيز المختلفة. تم الكشف عن تفاعلات الكازيين و  $\beta$  لاكتالبيمين مع بوليفينول في المرحلة المائية كشكل ثنائي ، بواسطة قياس الكثافة و LC-MS / MS. لم يؤثر تشكيل هذا الثنائي على الاستقرار التأكسدي للمستحلبات المختبرة. دراسة تأثير الزيوت الأساسية لسبقان و ازهار *P. scoparius* على تبلور الدهون (زيت النخيل منفرد ومزيج من الزيوت النباتية في المرحلة الدهنية) أظهرت تغيرا في سلوك البلورة متساوية الحرارة لتريجليسيريد مع تأخر التبلور ، وانخفاض محسوس في طاقات الذوبان المحسوبة ، وسرعة تبلور أبطأ وانخفاض حاد في مستويات المواد الصلبة. هذا التغير ملحوظ من خلال الحصول على أشكال وأحجام مختلفة بالنسبة لبلورات تريجليسيريد (Spherulites) للدهون التي تحتوي على الزيوت الأساسية بالمقارنة مع الدهون المسيطرة. التحريض لأثر تخفيف النظام بالزيوت الأساسية هو مستبعد ويقترح فرضية مشاركة أغلبية المونوترين في اضطراب أحداث البلورة (التنوي و النمو البلوري). يترتب عن هذه الدراسة أن التقييم و الاستغلال الصناعي للنبتين المدروستين مشجعان بقوة،بالاخص بالنسبة لـ *P. scoparius* ، التي تم استغلالها بالفعل في الصيدلة وحفظ الأغذية على النطاق التقليدي في الجزائر. بالإضافة إلى آثار المضادة للأكسدة للزيت الأساسي لهذه الأخيرة ، يقترح إمكانية استخدامها كمضاف طبيعي لتعديل تبلور الدهون للتطبيقات في التقصير و في مختلف المستحلبات الغذائية.

**كلمات مفتاحية:** مستخلصات فينولية خام، زيوت أساسية، *Pituranthos scoparius*، *Hibiscus sabdariffa* ، مستحلب، أصل اللبن، الاستقرار التأكسدي، تفاعلات البروتين-البوليفينول، مونوترين، التبلور.

## Résumé

---

Les antioxydants ont une incidence importante de nos jours tant sur le plan de la santé humaine que sur le plan technologique. Cette thèse met la lumière sur l'action de ces antioxydants sur la stabilité oxydative d'une émulsion à base de lactosérum type spread, mais aussi la cristallisation des lipides des huiles végétales constitutives de sa phase grasse. Les extraits phénoliques bruts de *Pituranthos scoparius* et *Hibiscus sabdariffa* et les huiles essentielles de la partie aérienne de *P. scoparius* ont été étudiés. Ces extraits ont été obtenus via des techniques d'extraction conventionnelles (décoction et hydrodistillation) et non conventionnelles (microondes et ultrasons). Des dosages spectrophotométriques ont été effectués pour rendre compte de la teneur des extraits bruts étudiés en composés phénoliques. Diverses techniques chromatographiques ont été appliquées pour la caractérisation et l'identification des diverses classes des antioxydants. L'activité antioxydante a été étudiée par les tests du pouvoir réducteur et de l'activité antiradicalaire. Différentes émulsions ont été formulées à l'échelle laboratoire et pilote, incorporées par les extraits phénoliques bruts des deux plantes et l'huile essentielle des tiges de *P. scoparius* à différentes concentrations. Leur stabilité oxydative a été évaluée par le test Rancimat. Les deux phases de l'émulsion étudiée ont fait objet de deux types d'études : interactions protéine-polyphénols dans la phase aqueuse et cristallisation des lipides dans la phase grasse, constituée par les huiles végétales de palme, soja et tournesol. Une Tricine SDS-PAGE dans la première étude et un ensemble de techniques d'investigation de la cristallisation isotherme (DSC, p-NMR et PLM) ont été utilisées. Les résultats des tests spectrophotométriques, chromatographiques et de l'activité antioxydante corroborent avec ceux de la stabilité oxydative et montrent un effet de protection contre l'oxydation des lipides aux concentrations faibles des extraits phénoliques bruts des deux plantes (100 et 300 ppm) et de l'huile essentielle de *P. scoparius* (100 ppm). L'évaluation sensorielle du spread incorporé à 100, 300 et 600 ppm de l'huile essentielle de *P. scoparius*, avec une analyse statistique en composantes principales (ACP) a révélée l'influence de certains attributs sensoriels sur la ségrégation des émulsions à ces différentes concentrations. Des interactions des caséines et de la  $\beta$ -lactoglobuline avec les polyphénols dans la phase aqueuse, sous forme de dimères caractéristiques, ont été révélées par analyse densitométrique et LC-MS/MS. La formation de ces dimères n'a pas affecté la stabilité oxydative des émulsions testées. L'étude de l'effet des huiles essentielles des tiges et des fleurs de *P. scoparius* sur la cristallisation des lipides (huile de palme seule et mélange des huiles végétales de la phase grasse) a montré une modification du comportement de la cristallisation isotherme des triglycérides avec un retard dans la cristallisation, une baisse des enthalpies de fusion calculées, des vitesses de cristallisations plus lentes et une baisse drastique des taux de solides. Cette modification est d'ailleurs perceptible par l'obtention de différentes formes et tailles pour les cristaux de triglycérides (sphérulites) des graisses contenant les huiles essentielles par rapport aux graisses témoins. L'induction d'un effet de dilution du système par les huiles essentielles est écartée et l'hypothèse de l'implication des monoterpènes majoritaires dans une perturbation des événements de cristallisation (nucléation et croissance cristallines) est proposée. Il en découle de cette étude que la valorisation et l'exploitation industrielle des deux plantes étudiées est vivement encouragée, notamment pour *P. scoparius* qui est déjà exploitée dans la pharmacopée et la conservation des aliments à l'échelle traditionnelle en Algérie. En complément des effets antioxydants de l'huile essentielle de cette dernière, il est suggéré la possibilité de son utilisation comme additif naturel pour modifier la cristallisation des corps gras pour des applications en shortenings et diverses émulsions alimentaires.

---

**Mots clés :** extraits phénoliques bruts, huiles essentielles, *Pituranthos scoparius*, *Hibiscus sabdariffa*, émulsion, lactosérum, stabilité oxydative, interactions protéine-polyphénols, monoterpènes, cristallisation.

## Abstract

---

Nowadays, antioxidants have a significant impact on both human health and food processing. This thesis sheds the light on the action of these antioxidants on the oxidative stability of a whey-based spread-type emulsion, but also the crystallization of fats in the fatty phase. The crude phenolic extracts of *Pituranthos scoparius* and *Hibiscus sabdariffa* and the essential oils of the aerial parts of *P. scoparius* were studied. These extracts were obtained via conventional extraction techniques (decoction and hydrodistillation) and non-conventional techniques (microwaves and ultrasounds). Spectrophotometric assays were performed for the assessment of the contents of total phenolics in the crude extracts studied. Various chromatographic techniques have been performed for the characterization and identification of the different classes of antioxidants. The antioxidant activity was studied by the tests of reducing power and antiradical activity. Different emulsions were formulated at both laboratory and pilot scales, incorporated by the concentrated crude phenolic extracts of the plants and the essential oil from stems of *P. scoparius* at different concentrations. Their oxidative stability was evaluated by Rancimat test. The two phases of the emulsion have been studied regarding two aspects: whey protein-polyphenol interactions in the aqueous phase and lipid crystallization in the fatty phase containing palm, soybean and sunflower oils. A Tricine SDS-PAGE was performed in the former and a set of investigation techniques for the study of isothermal crystallization (DSC, p-NMR and PLM) in the latter were applied. The results of spectrophotometric, chromatographic and antioxidant activity corroborate with those of oxidative stability and showed a protective effect against lipid oxidation at low concentrations of plant crude extracts (100 and 300 ppm) and the essential oil of *P. scoparius* (100 ppm). The sensory evaluation of the spread at 100, 300 and 600 ppm of the essential oil of *P. scoparius*, with a principal component analysis (PCA), revealed the influence of some sensory attributes on the segregation of emulsions at these different concentrations. The interactions of caseins and  $\beta$ -Lactoglobulin with polyphenols in the aqueous phase, with the formation of characteristic dimers, were revealed by densitometry and LC-MS/MS analysis. The formation of these dimers did not affect in any case the oxidative stability of the emulsions tested. The study of the effect of essential oils of stems and flowers of *P. scoparius* on lipid crystallization (palm oil alone and a mixture of the oils) showed a change in isothermal crystallization behavior of triglycerides with a delay of crystallization, a decrease in calculated enthalpies of fusion, slower crystallization rates and a drastic decrease in solid fat contents (SFC). This modification is also noticeable and different shapes and sizes of triglyceride crystals (spherulites) were visualized for fats with essential oils compared to control ones. The induction of a dilution effect of the system by the essential oils is discarded and the hypothesis of the implication of major monoterpenes in disturbing the crystallization events (nucleation and crystal growth) is proposed. From this study, it can be concluded that the recovery and industrial exploitation of the two plants studied is strongly encouraged, especially for *P. scoparius* which is already exploited in the Algerian traditional pharmacopoeia and food preservation. In addition to the antioxidant effects reported for the essential oil, it is suggested the possibility of its use as a natural additive to modify fat crystallization for applications in shortenings and various food emulsions.

---

**Key words:** crude phenolic extracts, essential oils, *Pituranthos scoparius*, *Hibiscus sabdariffa*, emulsion, whey, oxidative stability, protein-polyphenol interactions, monoterpenes, crystallization.