



HAL
open science

Étude cinétique et modélisation des effets des traitements thermiques et de l'environnement physico-chimique sur la dégradation et l'activité antioxydante des flavonoïdes

Hind Chaaban

► **To cite this version:**

Hind Chaaban. Étude cinétique et modélisation des effets des traitements thermiques et de l'environnement physico-chimique sur la dégradation et l'activité antioxydante des flavonoïdes. Ingénierie des aliments. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0065 . tel-01758727

HAL Id: tel-01758727

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01758727>

Submitted on 24 Jun 2019

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Dédicaces

Je dédie cet évènement marquant de ma vie :

A mes très chers parents. Que nulle dédicace ne puisse exprimer ce que je vous dois, pour votre bienveillance, affection, dévouement, sacrifices et soutien.

*A mon cher époux **Abdelmouniem SARHAN**, en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour son implication, son soutien, son encouragement et son amour inconditionnel pendant cette période si particulière.*

*A mes chers enfants, **Mouhamed, Sama et Samy**. C'est à vous mes anges, que maman dédie ce travail pour vous dire que vous resterez pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie.*

*A mes chères sœurs **Mouna et Israa** et mes chers frères **Othman, Sameer et Mohamad** pour le soutien dont vous avez fait toujours preuve à mon égard. Merci pour tout, que dieu vous garde pour moi.*

*A ma meilleure amie **Manelle** qui m'a aidée à surmonter toutes épreuves auxquelles j'ai été confrontée et avec laquelle, j'ai passé des moments inoubliables.*

A mes chers amis en France et en Syrie.

J'ai encore une infinie liste de personnes et je ne ferai pas le pari de les énumérer sans risque d'en omettre certains. Je m'astreins à un devoir de reconnaissance à l'égard de tous.

REMERCIEMENTS

Qu'il me soit permis d'exprimer mes sentiments de gratitude aux différentes personnes qui m'ont encadré et soutenu tout au long de mon travail rendant ainsi possible l'accomplissement du présent projet.

*Ma profonde gratitude s'adresse tout particulièrement au duo qui a dirigé ma thèse. Mon directeur de thèse, Professeur **Mohamed GHOUL**, qui en dépit de ses multiples occupations et sollicitations a accepté de diriger, encadrer et corriger cette thèse, sans oublier ses conseils et suggestions éclairés. Ma co-directrice de thèse Madame **Irina IOANNOU**, pour sa disponibilité, ses remarques constructives et pertinentes, et pour avoir lu et porter des correctifs à ce travail. Qu'ils trouvent à travers ce mémoire le fruit de leur encadrement.*

*Je remercie Madame **Marie de LAMBALLERIE** (Professeur, ONIRIS, Nantes) et Madame **Florence HUSSON** (Maître de conférences HDR, UMR PAM, Dijon) d'avoir apporté un regard critique à ce mémoire en tant que rapporteurs.*

*Je me sens redevable à l'égard de tous les membres de l'équipe **BioProMO**, et en particulier, Madame **Latifa CHEBIL** Aussi, un grand merci aux collègues et amis thésards que j'ai eu la chance de rencontrer et avec qui j'ai collaboré.*

Je voudrais remercier également les membres des différentes équipes qui m'ont accueillie dans leurs locaux. Leur disponibilité et leur savoir ont contribué au bon déroulement de cette thèse.

A tous ceux qui, de près ou de loin, directement ou indirectement, ont contribué à la concrétisation des objectifs visés par ce travail, je dis merci.

Sommaire

<i>Introduction générale</i>	6
<i>Bibliographie</i>	8
I. Les flavonoïdes	10
I.1 Source des flavonoïdes	10
I.2. Classification des flavonoïdes	12
I.3. Propriétés des flavonoïdes	18
I.3.1. Solubilité des flavonoïdes	18
I.3.2. Stabilité des flavonoïdes	19
I.4. Effet protecteur des flavonoïdes sur la santé humaine	23
I.4.1. Propriétés de protecteurs vasculaires	23
I.4.2. Propriétés anti-hépatotoxiques	23
I.4.3. Propriétés antiallergiques	24
I.4.4. Propriétés anti-inflammatoires	24
I.4.5. Propriétés anti-ulcérogènes	24
I.4.6. Autres propriétés	24
II. Effet des procédés sur les flavonoïdes	25
II.1. Effet des procédés thermiques sur la teneur en flavonoïdes	25
II.1.1. Procédés industriels	25
II.1.2. Procédés domestiques	28
II.1.3. Dégradation des flavonoïdes par microcalorimétrie	28
II.2. Effet des procédés mécaniques sur les flavonoïdes	29
II.3. Effet de la matrice alimentaire sur les flavonoïdes	29
II.4. Effet de l'environnement physico-chimique sur les flavonoïdes	31
II.4.1. Effet du temps et de la température de stockage	31
II.4.2. Effet de la lumière sur les flavonoïdes	32
II.4.3. Effet de l'oxygène sur les flavonoïdes	33
III. Activité anti-oxydante des flavonoïdes	34
III.1. Principe	34
III.2. Relation entre la structure du flavonoïde et son activité anti-oxydante	34
III.3. Mécanismes de Neutralisation des radicaux libres	37
III.4. Méthodes de mesure l'activité anti-oxydante des flavonoïdes	38
III.4.1. Mesure de l'activité anti-oxydante par évaluation de la capacité de l'anti-oxydante à piéger les radicaux libres	38

III.4.2. Mesure de l'activité anti-oxydante par dosage des produits résultants de l'oxydation .	42
III.5. Effet des procédés thermiques sur l'activité anti-oxydante des flavonoïdes.....	43
III.6. Effet des procédés de stockage sur l'activité anti-oxydante des flavonoïdes	44
III.7. Modélisation de l'évolution de l'activité anti-oxydante des flavonoïdes	45
IV. Détermination de la teneur en flavonoïdes	45
IV.1. Méthodes de mesure	45
IV.2. Modélisation des cinétiques de dégradation des flavonoïdes.....	46
V. Identification des produits de dégradation des flavonoïdes	52
Matériels et Méthodes.....	59
I. Matériels	60
I.1. Produits chimiques utilisés	60
I.2. Les flavonoïdes.....	60
II. Méthodes.....	61
II.1. Préparation des solutions modèles.....	61
II.2. Etude de l'effet d'un procédé thermique dans des conditions isothermes	62
II.2.1 Etude cinétique	62
II.2.2. Modélisation des cinétiques	63
II.3. Etude de l'effet d'un procédé thermique dans des conditions non isothermes.....	64
II.3.1. Etude cinétique	64
II.3.2 Modélisation des cinétiques	64
II.4. Etude de l'effet du stockage	65
II.5. Identification les produits de dégradation des flavonoïdes.....	66
II.6. Méthodes analytiques	67
II.6.1. Mesure de la teneur en flavonoïdes résiduelle	67
II.6.2. Mesure de l'activité anti-oxydante	67
II.6.3. Détermination les produits de dégradation des flavonoïdes	68
II.6.4. Analyse des données	69
Résultats.....	70
Chapitre I.....	71
Effet des procédés thermiques.....	71
I.1. Effet des procédés thermiques dans des conditions isothermes	72
I.1.1. Introduction.....	72
I.1.2. Contribution de l'article.....	85
I.2. Effet des procédés thermiques dans des conditions non isothermes.....	87
I.2.1. Introduction.....	87
I.2.2. Contribution de l'article.....	110
Chapitre II	111

<i>Effet de l'environnement physico-chimique</i>	111
<i>II. Effet de l'environnement physico-chimique sur le devenir des flavonoïdes et l'évolution de leur activité anti-oxydante</i>	112
<i>II.1. Introduction</i>	112
<i>II.2. Contribution de l'article</i>	122
<i>Conclusion</i>	123
<i>Références</i>	125
<i>Résumé de la thèse</i>	165

Figures

Figure 1: SQUELETTE DE BASE DES FLAVONOÏDES (HEIM ET AL., 2002)	12
Figure 2: SYSTEME DE CLASSIFICATION DES FLAVONOÏDES PROPOSE PAR CROFT (1998)	13
Figure 3: SYSTEME DE CLASSIFICATION DES FLAVONOÏDES PROPOSE PAR GAMET- PAYRASTRE (1999)	14
Figure 4: REPARTITION DES FLAVONOÏDES EN NEUF CLASSES (DI CARLO ET AL., 1999) ET (HOLLMAN ET KATAN, 1999).....	15
Figure 5: STRUCTURES DE L'ERIODICTYOL ET DE LA NARINGENINE	16
Figure 6: STRUCTURES DE LA RUTINE ET de LA QUERCETINE.....	17
Figure 7: STRUCTURES DE LA NARINGINE, de la LUTEOLINE-7-O-GLUCOSIDE ET DE LA VITEXINE	17
Figure 8: PROCESSUS ENZYMATIQUE CATALYSE PAR LA XANTHINE OXYDASE (COTELLE, 2001).....	21
Figure 9: LES ELEMENTS STRUCTURAUX RESPONSABLES DE L'ACTIVITE ANTI- OXYDANTE DES FLAVONOÏDES	35
Figure 10: STRUCTURE DE FLAVONOÏDES ET LE POUVOIR ANTIOXYDANT (RICE-EVANS ET AL. 1996)	36
Figure 11: FORMATION ET PIEGEAGE DU RADICAL ABTS•+ PAR UN ANTIOXYDANT DONNEUR DE H•	41
Figure 12: SCHEMA DE FRAGMENTATION DES PRODUITS DE DEGRADATION DE LA QUERCETINE (BUCHNER ET AL., 2006).....	54
Figure 13: MECANISME DE LA DEGRADATION THERMIQUE DE LA QUERCETINE- 3,4'- DIGLUCOSIDE ET DE LA FORMATION RESPECTIVE DE LA QUERCETINE (Ulbrich et al., 2015).....	55
Figure 14: DEMARCHE EXPERIMENTALE POUR ETUDIER L'EFFET DES TRAITEMENTS THERMIQUES ET L'ENVIRONNEMENT PHYSICO-CHIMIQUE SUR LES FLAVONOÏDES ...	58
Figure 15: STRUCTURE DES FLAVONOÏDES	61
Figure 16: PROTOCOLE DE L'ETUDE DE L'EFFET D'UN PROCEDE THERMIQUE DANS DES CONDITIONS ISOTHERMES.....	62
Figure 17: PROTOCOLE DE L'ETUDE DE L'EFFET D'UN PROCEDE THERMIQUE DANS DES CONDITIONS NON ISOTHERMES	64
Figure 18: PROTOCOLE DE L'ETUDE DE L'EFFET DU STOCKAGE	66
Figure 19: PROTOCOLE DE DETERMINER DES PRODUITS DE DEGRADATION DES FLAVONOÏDES	67

Tableaux

Tableau 1: DISTRIBUTION DES FLAVONOÏDES DANS LES FRUITS ET LEGUMES	11
Tableau 2: LES VALEURS DE LOG P DES FLAVONOÏDES ET DES SOLVANTS	19
Tableau 3: SYNERGIES POSITIVES ET NEGATIVES SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES COMBINAISONS DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	31
Tableau 4: POUVOIR ANTIOXYDANT ET TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES APRES LES TRAITEMENTS THERMIQUES	44
Tableau 5: LES PARAMETRES CLHP POUR L'IDENTIFICATION ET LA QUANTIFICATION DES FLAVONOÏDES	46
Tableau 6: MODELISATION DES CINETIQUES DE DEGRADATION DES ANTHOCYANES PENDANT LE STOCKAGE	47
Tableau 7: MODELISATION DES CINETIQUES DE DEGRADATION DES ANTHOCYANES PENDANT LE TRAITEMENT THERMIQUE	48
Tableau 8: MODELISATION DES CINETIQUES DE DEGRADATION DE LA QUERCETINE ET SES DERIVES	49
Tableau 9: PRODUITS DE DEGRADATION DE LA QUERCETINE.....	53
Tableau 10: CONCENTRATIONS DES DIFFERENTES SOLUTIONS DE FLAVONOÏDES ETUDIES	62

Introduction générale

L'alimentation a toujours été considérée comme un élément clé d'une bonne santé. Hippocrate a ouvert la voie à la diététique en prônant l'utilisation des légumes et des fruits "Que ton aliment soit ton seul médicament". Une phrase pleine de sens en notre siècle avec l'augmentation des problèmes de santé. L'apparition de nombreuses maladies a été mise en relation avec des niveaux élevés de radicaux libres dans les organismes. Les radicaux libres sont des molécules instables produites essentiellement dans le processus de transformation des nutriments en énergie. Ces molécules sont très réactives et occasionnent des dégâts quand elles sont produites en excès. En effet, le déséquilibre entre la production de radicaux libres et la capacité à neutraliser ces composés conduit au stress oxydant (**Betteridge, 2000**). Les dommages résultants de l'oxydation sont considérés comme la cause principale des dégénérescences cellulaires entraînant de nombreuses maladies telles que le cancer, alzheimer... Les dommages causés par les radicaux libres peuvent être empêchés ou retardés par l'action de molécules dites antioxydantes. D'une manière générale, un antioxydant peut entrer en compétition avec un radical pour éviter l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Parmi les antioxydants, les flavonoïdes sont les molécules les plus étudiées. Cet engouement est dû grâce à leur propriété anti-oxydante et leur abondance dans les matières premières d'origine végétale. De nombreuses études épidémiologiques ont montré le lien entre la richesse du régime alimentaire en composés phénoliques et la diminution d'apparition de certaines maladies (cancers, maladies coronaires ou dégénératives cellulaires) (**Tomás-Barberán et al., 2000**). Afin de proposer des formulations d'aliments enrichis en flavonoïdes, de nombreux auteurs ont mené des investigations pour déterminer le profil en composés phénoliques et le pouvoir antioxydant de différentes sources végétales notamment les fruits et les légumes (**Nicoli et al., 1999**). Ces aliments peuvent être consommés à l'état brut, transformés et/ou rajoutés à d'autres ingrédients (**Dyrby et al, 2001**). Pour que les flavonoïdes consommés à l'état d'aliments conservent leurs propriétés, il faut s'assurer que ceux-ci n'aient pas été dégradés lors de la fabrication de l'aliment. En effet, l'activité anti-oxydante des flavonoïdes varie en fonction de leur structure (**Heim et al., 2002**). Toute modification de la structure du flavonoïde peut altérer ses propriétés. Il paraît alors primordial de s'intéresser aux effets des procédés de formulation alimentaire (procédés thermiques, mécaniques) sur le devenir des flavonoïdes et sur l'évolution de leurs activités biologiques. De plus ces molécules

très actives sont aussi très sensibles à leur environnement, des précautions devront être prises lors de leur manipulation et de leur stockage (**Bergquist et al., 2007**). Ainsi, il est aussi pertinent d'étudier l'effet de l'environnement physico-chimique (oxygène, lumière, pH) sur le devenir des flavonoïdes. Cependant, des interactions avec la matrice d'incorporation lors de la préparation des aliments peuvent avoir lieu et affecter les activités biologiques des flavonoïdes (**Jiménez-Aguilar et al, 2011**). Donc, pour étudier les effets des procédés et de l'environnement physico-chimique sur le devenir des flavonoïdes, des solutions modèles de flavonoïdes devront être utilisées afin de s'affranchir de l'effet de la matrice alimentaire.

L'objectif principal de la thèse est d'élaborer un outil de prédiction de l'évolution de la teneur en flavonoïde et de leur activité anti-oxydante selon leur structure et les conditions opératoires appliquées. Pour cela, nous avons étudié l'effet d'un traitement thermique et de l'environnement physico-chimique sur le devenir de six flavonoïdes de structures différentes et sur l'évolution de leur activité anti-oxydante. Les cinétiques de dégradation des flavonoïdes ont été tracées et modélisées selon les différentes conditions opératoires. Les informations obtenues permettront de discuter de la relation entre la sensibilité, l'évolution de l'activité et la structure du flavonoïde en fonction de différentes conditions opératoires.

Au cours de ce mémoire, notre travail se subdivisera donc en quatre chapitres : Le premier chapitre, est consacré à une étude bibliographique concernant les flavonoïdes (source, classification, propriétés, effet protecteur sur la santé), l'activité anti-oxydante des flavonoïdes, l'effet des procédés et de l'environnement physico-chimique sur les flavonoïdes et l'identification des produits de dégradation des flavonoïdes. Le deuxième chapitre, présente le matériel et les méthodes ayant été utilisés pour mener cette étude. Le troisième chapitre, expose les différents résultats trouvés sur l'effet des procédés thermiques dans des conditions isothermes et non isothermes, et sur l'effet de l'environnement physico-chimique (lumière et oxygène) sur le devenir des flavonoïdes et l'évolution de leur activité anti-oxydante.

Bibliographie

Les flavonoïdes sont les produits du métabolisme secondaire des plantes, plus de 6000 molécules ont été décrites (**Harborne et Williams, 2000**). Dans le règne végétal, les flavonoïdes jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques tels que la pigmentation des végétaux, la protection contre des agents pathogènes (virus, bactéries), l'aide à la reproduction (**Bovy et al., 2007**). La consommation de flavonoïdes apporte des bienfaits pour la santé. En effet, grâce à leurs nombreuses activités biologiques (activité anti-oxydante, activité antibactérienne, activité antifongique...), les flavonoïdes permettent de réduire l'apparition de certaines maladies telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, les maladies neurodégénératives (**Kuo, 1997**). Les effets biologiques des flavonoïdes sont principalement attribués à leur activité anti-oxydante. En effet, grâce à leur pouvoir antioxydant, les flavonoïdes permettent de protéger notre organisme contre les radicaux libres et ainsi, ils permettent de diminuer le risque de survenue de nombreuses pathologies (**Manach et Donovan, 2004**). Les flavonoïdes étant abondants dans les matières premières végétales ainsi ils représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation (**Cook et Samman, 1996**). De ce fait, beaucoup d'études ont porté sur les flavonoïdes que ce soit pour étudier leur distribution dans les matières premières végétales ou pour étudier l'effet des procédés sur leur devenir dans des matrices alimentaires (**Nicoli et al., 1999**) (**Tomás-Barberán et al., 2000**) (**Ioannou et al., 2012**).

Les propriétés des flavonoïdes sont principalement déterminées par leur structure (**Halliwell, 1994**) (**Heim et al., 2002**). Ainsi pour des propriétés identiques, des éléments structuraux similaires seront retrouvés dans les molécules. En effet, la plupart du temps, les flavonoïdes subissent des traitements permettant leur transformation en produits alimentaires finis. La stabilité de la molécule permettra de préserver sa structure et ainsi ses activités biologiques.







Dans la partie bibliographique, les points suivants seront abordés : dans une première partie, nous présenterons la diversité des structures des flavonoïdes ainsi que l'ensemble de leurs activités biologiques. Par la suite, nous poursuivrons en présentant la synthèse des études portant sur l'effet des procédés de formulation et de stockage (temps, lumière, oxygène) sur la dégradation des flavonoïdes. Puis, une troisième partie sera consacrée à l'activité anti-oxydante des flavonoïdes (relation activité-structure, méthodes de mesure du pouvoir anti-oxydant, effet des procédés thermiques et du stockage). Dans une dernière partie, les études portant sur l'identification des structures des produits de dégradation des flavonoïdes suite aux traitements subis seront présentés.

I. Les flavonoïdes

I.1 Source des flavonoïdes

L'organisme humain ne synthétise pas de flavonoïdes. Le seul apport de flavonoïdes se situe dans notre alimentation (**Guerra et al., 2004**). En effet, les flavonoïdes se trouvent dans les fruits, les légumes, certaines boissons (vin rouge, thé, café, bière) et les condiments. Le tableau 1 présente la distribution des flavonoïdes dans les fruits et les légumes.

TABLEAU 1: DISTRIBUTION DES FLAVONOÏDES DANS LES FRUITS ET LEGUMES

Classe	Molécules principales	Distribution
Flavanone	Naringine, taxifoline, hespéritine	eucalyptus globulus, citrus et agrumes 
Flavonol	quercétine, kaempférol et myricétine et	olive, thé noir, pomme, pamplemousse, radis, endive, brocoli, oignon, chou, laitue, vin rouge, raisin Vitis vinifera, Sophora japonica, Stellaria media 
Flavone	Lutéoline, apigénine, chrysin	herbes aromatiques (persil, romarin, thym) pomme, céleri, grains de céréale... Petroselinum sativum, Apium graveolens... 
Flavan-3-ols	(-)-epicatéchine, (-)-epigallocatechine et leurs esters de gallate (+)-catéchine	vin rouge, thé vert et noir Vitis vinifera 
Isoflavones	daidzeine, genisteine	légumineuses (haricots noirs et pois chiches verts, soja), pousses de luzerne et de trèfle et les graines de tournesol. Pueraria labata, stellaria media 
Anthocyanes	pelargonidine, cyanidine	légumes et fruits rouges et violets (pommes, raisins, baies, kaki, cassis...) 

Les flavonoïdes les plus répandus dans les matrices végétales sont : la quercétine, le kaempférol, la myricétine et l'apigénine alors que la distribution naturelle de la naringénine, la catéchine, le dihydrokaempférol, la dihydroquercétine, le leucopélargonidol et le leucocyanidol est restreinte (Birt et al., 2001) (Havsteen, 2002). Les flavonoïdes les plus représentés appartiennent aux flavones et aux flavonols.

I.2. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont définis avec une structure de base commune formée de deux cycles aromatiques (cycle A et cycle B) reliés par trois atomes de carbone qui forment un hétérocycle oxygéné (figure 1) (Heim et al., 2002).

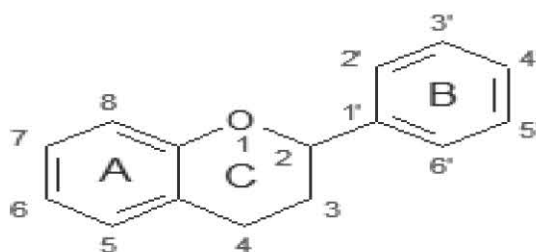


FIGURE 1: SQUELETTE DE BASE DES FLAVONOÏDES (HEIM ET AL., 2002)

Les flavonoïdes diffèrent entre eux généralement par :

- Le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles...) sur les deux cycles aromatiques et l'hétérocycle en C3,
- La présence d'un groupement énone¹ entre C2 et C3.
- La présence d'un groupement carbonyle en C4.

Il n'existe pas une classification unique pour les flavonoïdes. Plusieurs classifications ont été proposées s'appuyant en partie sur les trois critères présentés précédemment.

Les plus répandues sont présentées ci-dessous.

Croft (1998) a utilisé sept caractéristiques pour classer les flavonoïdes, qui sont :

- La nature du groupement en position 3.
- La présence d'un groupement catéchol² sur le cycle B.
- La présence de deux groupes hydroxyles aux positions 3 et 5.
- La présence d'un motif énone conjugué avec un groupement carbonyle en position 4
- La présence simultanée de doubles liaisons en 2-3 et 4-5.
- L'absence de groupes alcoxyle et glycoxyle sur l'anneau B.

¹ Le motif énone est défini comme une double liaison entre C2 et C3 sur l'hétérocycle

² Le motif catéchol indique deux groupements hydroxyles adjacents en position 3 et 4

- L'absence de groupes alcoyles et glycoyles sur l'anneau A.

Ainsi, Croft (1998) a proposé une classification des flavonoïdes en six groupes (figure 2). Il a utilisé cette classification pour étudier la relation structure - pouvoir antioxydant des flavonoïdes.

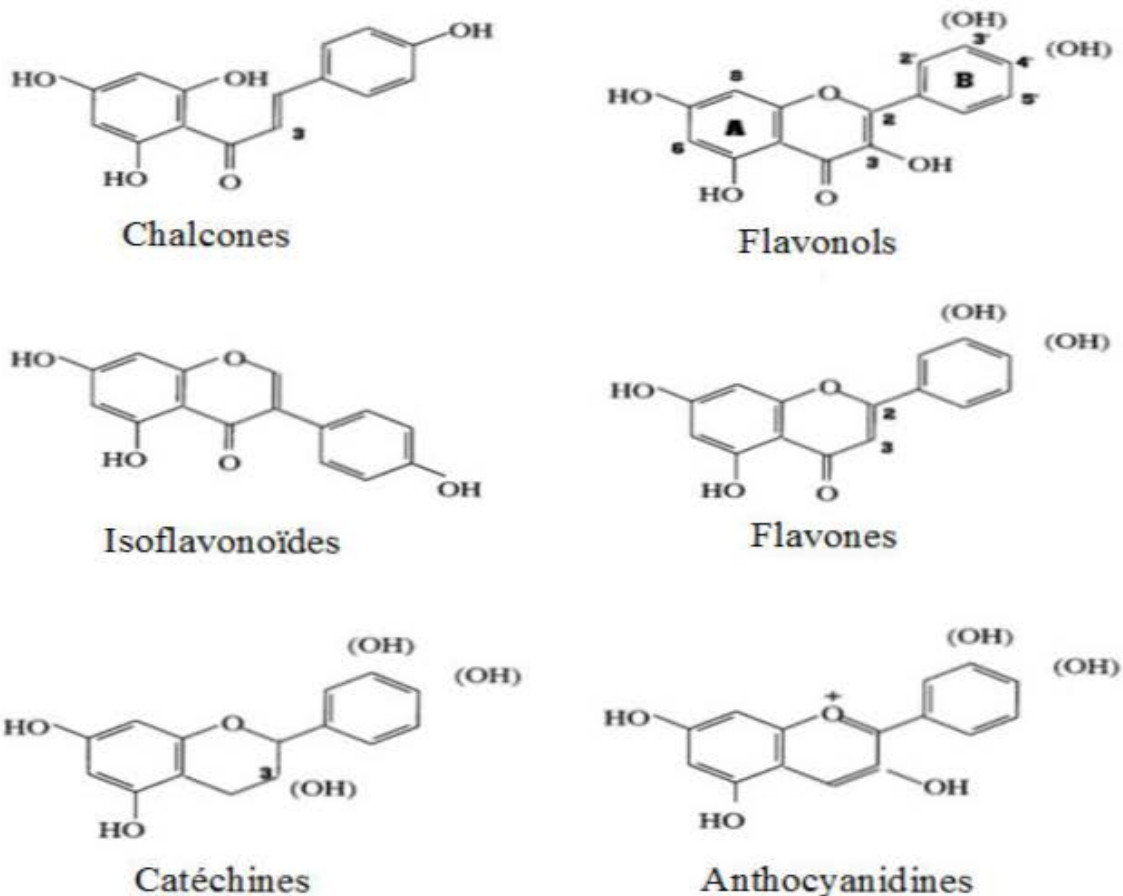


FIGURE 2: SYSTEME DE CLASSIFICATION DES FLAVONOÏDES PROPOSE PAR CROFT (1998)

Un autre système de classification a été proposé par **Gamet-Payraastre (1999)**. Les flavonoïdes ont été divisés en 6 classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (cycle C) (figure 3). Cette classification a été utilisée pour comparer les effets inhibiteurs des flavonoïdes à différentes enzymes telles que la PKC³, et la PI 3-kinases⁴.

³ PKC (la protéine kinase C) catalyseur du transfert d'un groupe phosphate de l'ATP sur l'hydroxyle des chaînes latérales des acides aminés ayant une fonction alcool.

⁴ PI3-kinases (La phosphoinositide 3-kinase) est une enzyme permettant la transformation des phosphoinositides en phosphatidylinositol-3-phosphate.

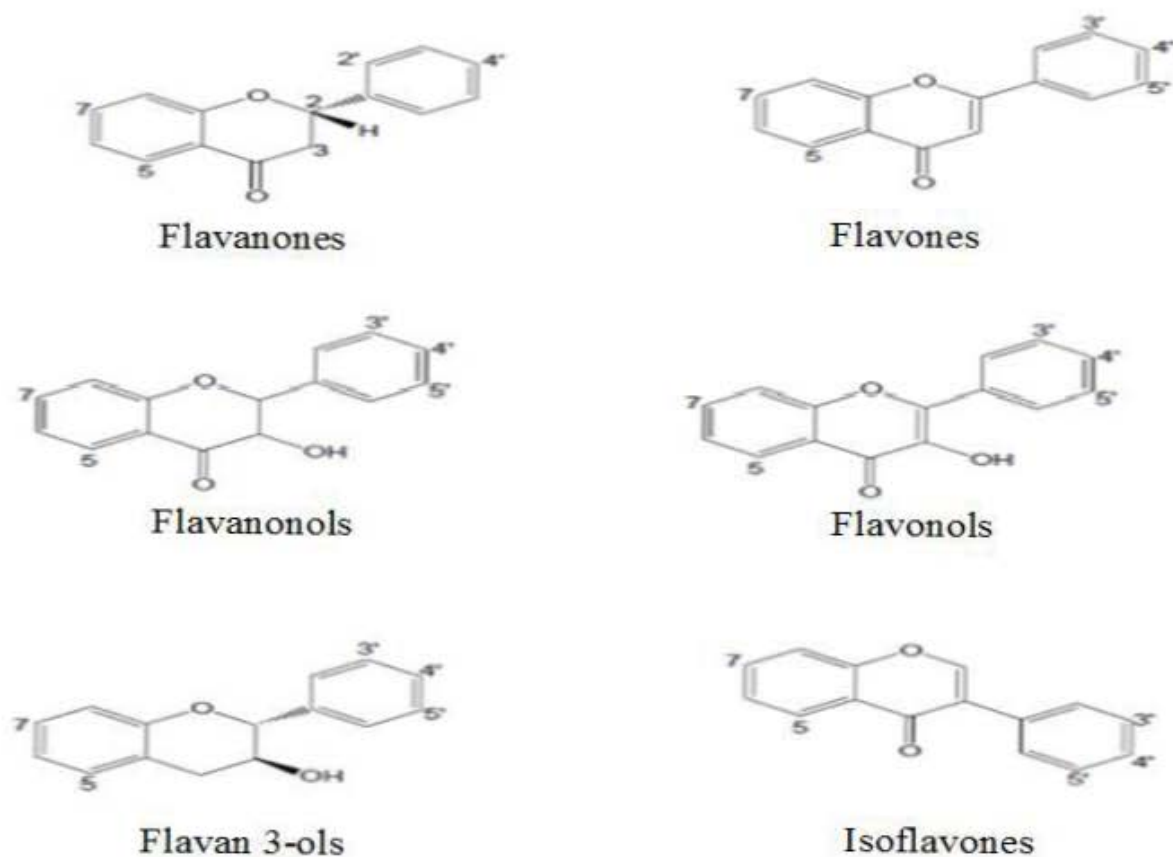


FIGURE 3: SYSTEME DE CLASSIFICATION DES FLAVONOÏDES PROPOSE PAR GAMET-PAYRASTRE (1999)

Di Carlo et al. (1999) et **Hollman et Katan (1999)** ont proposé une répartition des flavonoïdes en neuf classes : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols (flavan-3-ols), les isoflavones, les dihydroflavonols, les chalcones, les auronnes et les anthocyanes (figure 4).

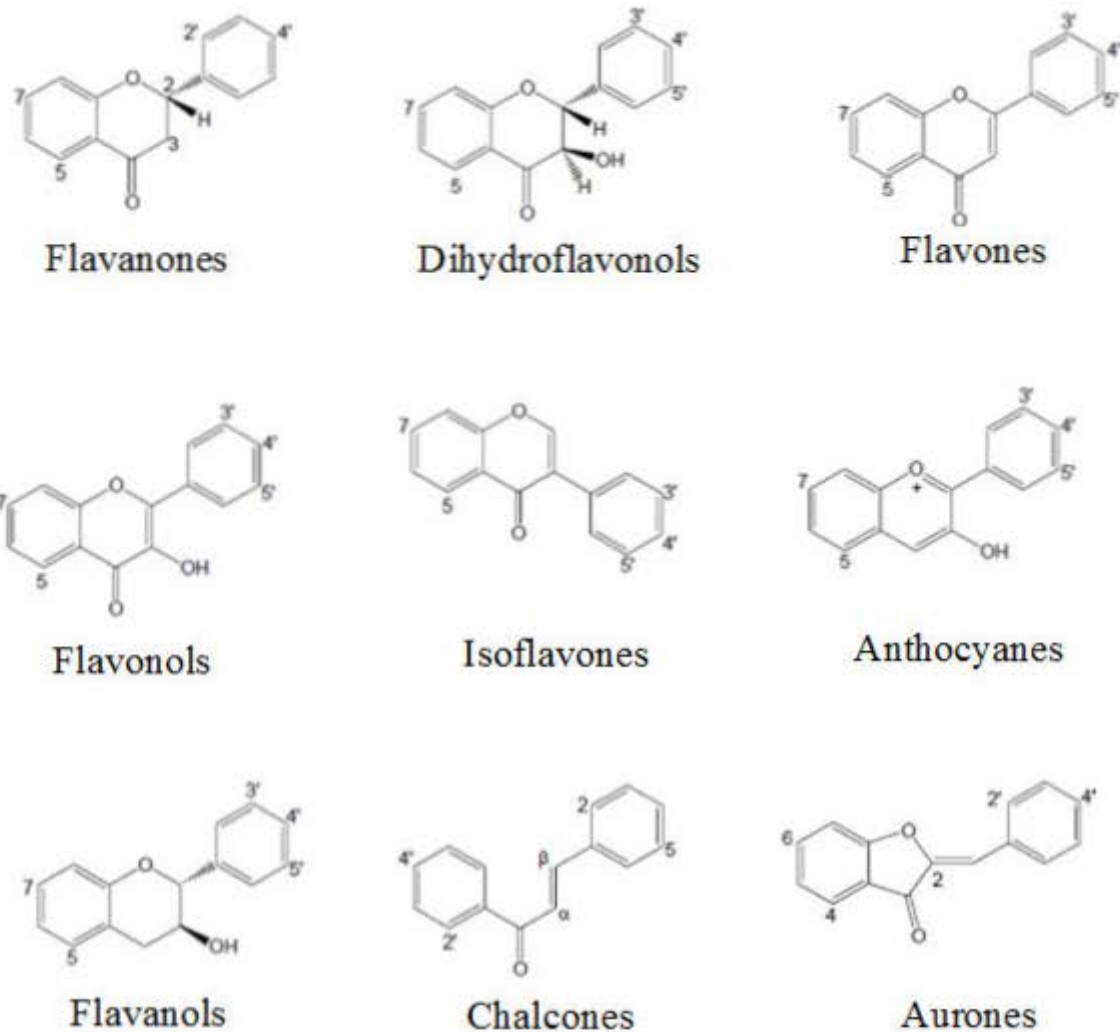


FIGURE 4: REPARTITION DES FLAVONOÏDES EN NEUF CLASSES (DI CARLO ET AL., 1999) ET (HOLLMAN ET KATAN, 1999)

Cette classification s'appuie sur des différences de structure entre les flavonoïdes. Celles-ci sont énoncées ci-dessous.

- Les flavones et flavonols : ils possèdent la structure de base des flavonoïdes avec un groupement catéchol et un groupement carbonyle en C4. Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C3
- Les dihydroflavonols : ils ont la même structure que les flavonols excepté le motif énone.
- Les flavanones : ils se caractérisent par l'absence du motif énone et d'un groupement OH en position 3.

- Les isoflavones : ils ont la même structure que les flavones excepté que le cycle B est connecté sur l'hétérocycle en position 3 au lieu de la position 2.
- Les flavanols : ils sont caractérisés par l'absence de motif énone, l'absence du groupement carbonyle en C4 et par la présence d'un OH en C3.
- Les anthocyanidols (anthocyanidines) ont deux doubles liaisons dans le cycle C qui par conséquence porte une charge positive.
- Les chalcones : elles diffèrent des autres types de flavonoïdes par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées de deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée cétonique α , β -insaturée. Le cycle B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes.
- Les aurones : elles sont caractérisées par une structure 2-benzylidène coumaranone.

Pour ces deux dernières classes, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes.

Les molécules d'une même classe diffèrent entre elles par le nombre et la position des groupements hydroxyles. Par exemple, l'ériodictyol a quatre groupes hydroxyles en position 3', 4', 5 et 7, alors que la naringénine qui appartient à la même classe, en a seulement trois groupes en position 3', 5 et 7 (figure 5).

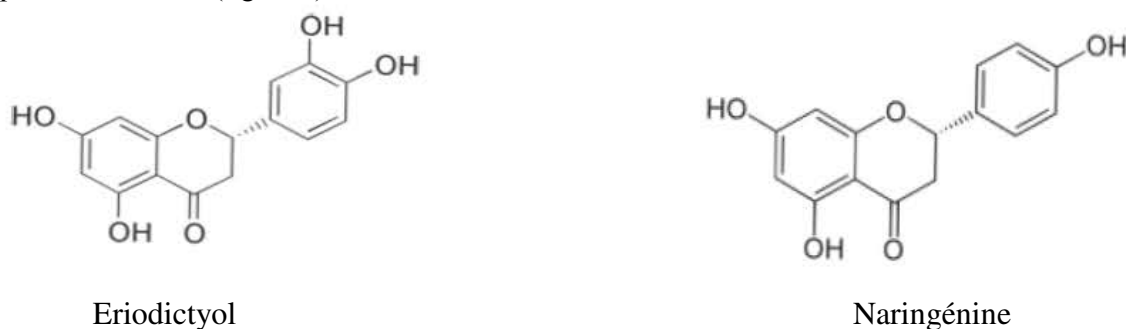
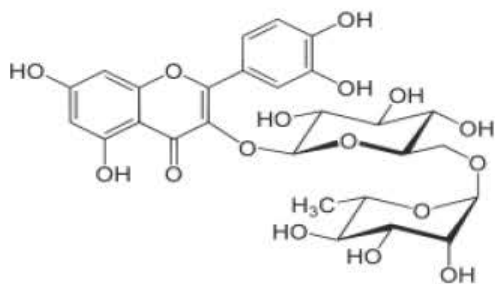
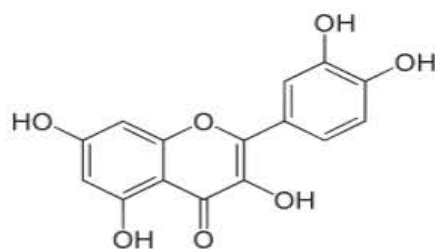


FIGURE 5: STRUCTURES DE L'ERIODICTYOL ET DE LA NARINGENINE

Les flavonoïdes cités précédemment sont appelés aglycones car sans substituant. Ils peuvent se rencontrer sous forme substituée à l'aide d'un groupement glycosyl, ils sont alors appelés glycosylés. Par exemple, la rutine est un dérivé glycosylé de la quercétine avec un sucre en position 3 (figure 6).



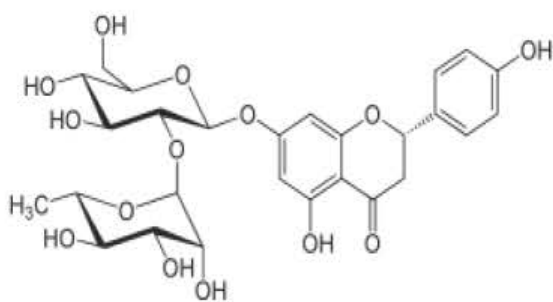
Rutine (Flavonol)



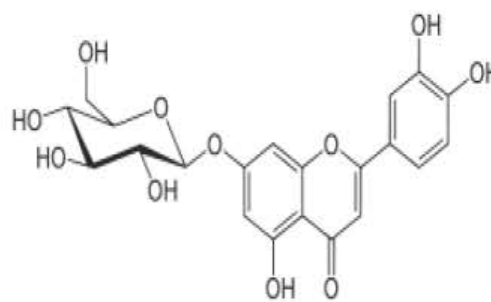
Quercétine (Flavonol)

FIGURE 6: STRUCTURES DE LA RUTINE ET DE LA QUERCÉTINE

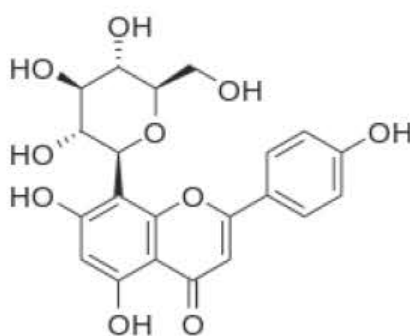
Les flavonoïdes glycosylés peuvent varier pour un même flavonoïde selon la position de la substitution (position 3 pour la rutine et position 7 pour la naringine), le type de liaison (type O pour la naringine, type C pour la vitexine) et la nature du groupement glycosyl (rhamnose-glucose pour la rutine et glucose pour la lutéoline-7-O glucoside) (figure 7)



Naringine



Luteoline-7-O-glucoside



Vitexine

FIGURE 7: STRUCTURES DE LA NARINGINE, DE LA LUTEOLINE-7-O-GLUCOSIDE ET DE LA VITEXINE

Les différences de structure engendrent des différences de propriétés entre les flavonoïdes (**Fargeix, 2000**). Il a montré que la présence d'un groupement glycosyl modifie les propriétés du flavonoïde par rapport à son analogue aglycone. Parmi les modifications, on notera une diminution de l'activité anti-oxydante (la quercétine 4,7 mM, la rutine 2,4 mM), une augmentation de sa solubilité (la solubilité de la quercétine dans l'eau est de 10 mg/l et de 125 mg/l pour la rutine) et une diminution de son hydrophobicité (le log P de la rutine est de -0,64 et 1,82 pour la quercétine).

1.3. Propriétés des flavonoïdes

1.3.1. Solubilité des flavonoïdes

La solubilité est la quantité maximale d'une substance chimique appelée soluté qui peut se dissoudre dans un solvant. La solubilité d'une substance dans un solvant est mesurée par la concentration de saturation, c'est-à-dire la quantité maximum que l'on peut dissoudre sans avoir de précipité. La solubilité d'une substance dépend des propriétés physiques et chimiques du soluté et du solvant ainsi que de la température et du pH de la solution (**Estime et al., 2010**). Une différence de solubilité est constatée parmi les flavonoïdes, celle-ci est due aux différences de structure entre les flavonoïdes. La solubilité du flavonoïde est proportionnelle à sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec le solvant (**Saidman et al., 2002**). Par exemple, la solubilité de la naringine dans l'eau à 20°C est de 0,5 g/L et celle de la quercétine dans les mêmes conditions inférieure à 10 mg/L. En effet, la présence d'une substitution en position 7 dans la naringine conduit à une augmentation du nombre de liaisons hydrogènes avec le solvant, et donc à une augmentation de la solubilité du flavonoïde (**Calias et al., 1996**). De plus, certains flavonoïdes sont solubles dans des solvants polaires alors que d'autres sont solubles dans des solvants apolaires (**Bruneton, 1999**). L'affinité des flavonoïdes vis-à-vis des solvants peut être évaluée en déterminant le logP. Le log P permet de déterminer le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule. Il est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau. Si cette valeur est positive et très élevée, on peut dire que la molécule est plus soluble dans l'octanol que dans l'eau c'est-à-dire que celle-ci a un caractère hydrophobe. Quelques valeurs de LogP pour des flavonoïdes et des solvants sont données dans le tableau 2.

TABEAU 2: LES VALEURS DE LOG P DES FLAVONOÏDES ET DES SOLVANTS

	Molécule	Log P
flavonoïdes	lutéoline	3,22±0,08
	kaempférol	3,11±0,54
	génistéine	3,04±0,02
	apigénine	2,92±0,06
	naringinine	2,60±0,03
	daidzéine	2,51±0,06
	ériodictyol	2,27±0,02
	glycitéine	1,97±0,05
	quercétine	1,82±0,32
	génistéine-7-glucoside	0,97±0,01
	quercétine-3-glucoside	0,76±0,01
	quercétine-7-sulfate	0,74±0,02
	lutéoline 7-o-glucoside	0,58±0,02
	daidzéine -7-glucoside	0,32±0,02
	rutine	-0,64±0,05
quercétine-3-sulfate	-1,11±0,01	
solvants	Propan-1-ol	0,25
	Éthanol	-0,33
	Méthanol	-0,77
	propylène glycol	-0,92

Rothwell et al. (2005) ont montré que la quercétine était le flavonoïde le moins lipophile par rapport au kaempférol, à la genistéine et à la daidzéine.

Les conditions de solubilisation permettent d'augmenter la limite de solubilité des flavonoïdes. En effet, l'augmentation de la température de solubilisation permet d'augmenter la solubilité des flavonoïdes (**Benavente-Garcia et al., 2001**). Cependant les flavonoïdes étant thermosensibles, ce levier d'action reste peu utile pour les flavonoïdes. La solubilisation dans des conditions basiques permet également d'augmenter la solubilité des flavonoïdes (**Luo et al., 2012**).

I.3.2. Stabilité des flavonoïdes

Certains travaux ont montré que la stabilité des flavonoïdes dépend de leur structure. En effet, la présence d'un groupement OH en position 3 rend le flavonoïde très sensible à l'oxydation (**Smith et al., (2000)**). De plus, il a été montré que plus un flavonoïde comporte de groupements OH moins il est stable (**Biesaga et Pyrzynska, 2013**). Un flavonoïde est plus stable lorsque les groupements OH sont substitués (glycosylation, méthylation) (**Biesaga et Pyrzynska, 2013**).

Des résultats similaires ont été trouvés par **Qiao et al., 2014**. La quercétine (5 groupements OH, aucune substitution) en solution dans 80% éthanol/20% eau a été dégradée de moitié tandis que les

concentrations de l'hespéridine (2 groupements OH, un glycosyl et un methoxyl) et de la naringine (deux groupements OH, un glycosyl) ne changent que légèrement.

Il a également été montré que la stabilité des flavonoïdes est affectée par la nature du solvant.

Paniwnyk et al. (2001) ont constaté que les flavonoïdes dans un solvant aqueux produisent de grandes quantités de radicaux hydroxyles qui induisent la dégradation de la rutine tandis que ce phénomène est quasi inexistant dans du méthanol pur. De plus, les voies de dégradation des flavonoïdes sont différentes selon les solvants dans lesquels ils sont solubilisés (**Fargeix, 2000**, **Tommasini et al. (2004)**).

I.3.3. Activités biologiques des flavonoïdes

I.3.3.1. Activité anti-oxydante

L'oxydation est une réaction d'oxydo-réduction qui mène à la production de radicaux libres. Les radicaux libres sont des molécules chimiques instables, très réactives, qui réagissent avec les structures cellulaires entraînant de nombreux dégâts comme le vieillissement cellulaire. Les antioxydants sont capables de stopper ces réactions en chaîne en réduisant les radicaux libres et en annihilant ainsi leur action. Les flavonoïdes sont considérés comme des antioxydants efficaces pour protéger les cellules contre les effets nocifs des radicaux libres (**Fuhrman et al., 1995**). Les mécanismes de l'activité anti-oxydante seront détaillés dans la partie III de la bibliographie.

I.3.3.2. Inhibition de diverses enzymes

Un inhibiteur enzymatique est une substance se liant à une enzyme et qui en diminue l'activité. Plusieurs modes d'inhibition existent : (i) compétitif (il s'agit d'empêcher la fixation du substrat sur le site actif en se fixant à sa place), (ii) non compétitif (il s'agit de provoquer une déformation de l'enzyme la rendant inactive (inhibiteur allostérique)) ou (iii) mixte (il s'agit de cumuler le mode compétitif et le mode non compétitif). L'inhibition des enzymes joue un rôle important dans le contrôle des mécanismes biologiques, et notamment dans la régulation des voies métaboliques. Les flavonoïdes sont responsables de l'inhibition de très nombreuses enzymes et notamment les enzymes directement impliquées dans le stress oxydant. Ces enzymes sont : la xanthine oxydase, les nitrique oxyde synthases (NOS), les lipoxygénases, les cyclooxygénases et la glutathione S-tranférase.

a- Xanthine oxydase

McCord et Fridovich (1969) ont démontré que la xanthine oxydase participe à la production de radicaux libres. En effet, la xanthine oxydase catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Cette réaction est accompagnée par la formation de radicaux libres à partir du dioxygène (figure 8).

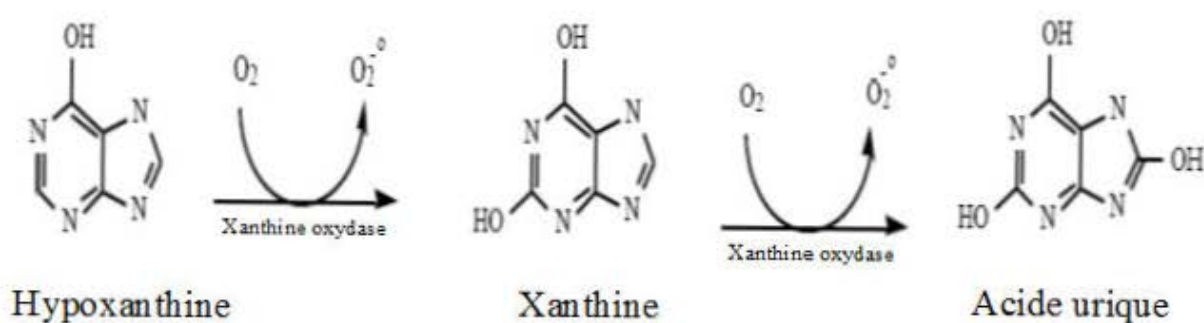


FIGURE 8: PROCESSUS ENZYMATIQUE CATALYSE PAR LA XANTHINE OXYDASE (COTELLE, 2001)

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la xanthine oxydase. En effet, **Cos et al. (1998)** ont montré que la présence de groupements OH en C5 et C7, la présence d'un groupement énone ainsi que l'absence d'un groupement OH en C3 jouent un rôle important dans l'inhibition de la xanthine oxydase. **(Redrejo-Rodriguez et al., 2004)** ont, quant à eux, observé que la présence de fonctions hydroxyles en position 3 ainsi que l'absence de substituants en position 6 jouaient un rôle dans l'inactivation de cette enzyme.

b- NO synthase

Les NO synthases constituent un groupe d'enzymes responsables de la synthèse de l'oxyde nitrique à partir de l'arginine. L'oxyde nitrique (NO) a des effets régulateurs s'exerçant sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme telles que le maintien du tonus vasculaire, de la neurotransmission, du fonctionnement rénal **(Hare, 2004)**. Toutefois, il arrive que cette production devienne incontrôlée et entraîne des dommages, le NO peut former avec l'anion superoxyde le peroxynitrite (HOONO), qui est un oxydant puissant, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques. Les flavonoïdes jouent un rôle important dans le contrôle de la production de cette enzyme **(Huk et al., 1998)**. En effet, ils sont considérés comme des inhibiteurs potentiels de l'oxyde nitrique synthase **(Chen et al., 2001) (Chan et al., 2000)**.

c- Lipoxygénases

Les lipoxygénases sont des dioxygénases à atome de fer non héminique. Ils sont responsables de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (**Delattre et al., 2005**). En effet, la lipoxygénase transforme ces acides gras polyinsaturés en hydroperoxydes de l'acide gras correspondant. Les hydroperoxydes lipidiques jouent un rôle significatif dans le risque vasculaire associé à certaines pathologies telles que le diabète. Les flavonoïdes sont capables d'inhiber les enzymes lipoxygénases (**Perusse et Leech, 2003**). Le flavonoïde le plus étudié est la quercétine. En effet, la quercétine est connu comme un puissant inhibiteur des enzymes lipoxygénases.

I.3.3.3. Activité antibactérienne

Les flavonoïdes ont une action antibactérienne surtout contre les Gram -. Cette action est due aux groupements carbonyles des flavonoïdes qui réagissent avec les SH des bactéries empêchant leur croissance. Les isoflavonoïdes sont considérés comme des inhibiteurs de la SAMR (*Staphylococcus aureus méticilline résistants*). **Botta et al. (2009)** ont suggéré que les isoflavonoïdes inhibent cette bactérie en interférant avec l'incorporation de métabolites et de nutriments dans les cellules bactériennes. L'érichristagalline (isoflavonoïde prénylé) joue un rôle dans la prévention des caries dentaires, en inhibant la croissance bactérienne (**Guan et al., 2012**).

I.3.3.4. Activité antifongique des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont également une activité antifongique. Par exemple, la catéchine exerce un effet inhibiteur sur la croissance des champignons pathogènes (**Nohynek et al, 2006**). Le mécanisme d'action reste encore inconnu mais l'efficacité et la disponibilité à faible coût et à faible toxicité font des flavonoïdes des fongicides naturels intéressants (**galeotti 2008**).

I.3.3.5. Activité antivirale des flavonoïdes

L'activité antivirale des flavonoïdes a été identifiée depuis 1940. D'après **Middleton et al., (2000)** la quercétine, la morine, la rutine, la dihydroquercétine, la dihydrofisetine, la leucocyanidine, l'apigénine, la catéchine, l'héspéridine et la naringine possèdent une activité antivirale contre 11 types de virus. L'activité antivirale semble être associée aux composés non glycosylés. L'hydroxylation en position 3 est apparemment nécessaire à cette activité. La myricétine empêche la croissance de *Burkholderia cepacia multi-résistante*, *Enterococci vancomycine-résistante*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus epidermidis* (**Hodek et al.,**

2002). La lutéoline peut être utilisée pour développer un médicament antiviral contre le virus de l'encéphalite japonaise (Fan et al., 2016).

1.4. Effet protecteur des flavonoïdes sur la santé humaine

Le bienfait des flavonoïdes sur la santé humaine a été montré par de nombreuses études notamment en ce qui concerne les maladies cardiovasculaires, les hépatites, les inflammations, les allergies et les ulcères.

1.4.1. Propriétés de protecteurs vasculaires

L'effet de protection vasculaire est apporté par les flavonoïdes en maintenant la perméabilité vasculaire dans un état normal de fonctionnement (Shih et al., 2004). L'O- β -hydroxyéthyl rutoside (HR) est utilisé comme un traitement chez des patients présentant une insuffisance veineuse chronique où l'HR a permis de restaurer les paramètres hémorhéologiques altérés. De plus, les effets de certains flavonoïdes sur les plaquettes, les leucocytes et sur les enzymes intervenant dans la coagulation sanguine, conduisent à une augmentation de la résistance des capillaires (Stoclet et al., 2004). Lee et al. (2014) ont suggéré que la lutéoline-8-C-glucoside protège l'intégrité de la barrière vasculaire en inhibant l'hyperperméabilité, par conséquent il est utile en tant que thérapie pour des maladies inflammatoires vasculaires.

1.4.2. Propriétés anti-hépatotoxiques

Les flavonoïdes ont été utilisés dans le traitement des affections hépatiques depuis des siècles en médecine traditionnelle. Gilani et al. (1997) et Jassim et Naji (2003) ont extrait les flavonoïdes de *Silybum marianum* (chardon marie). Les principes actifs de l'extrait sont constitués d'un mélange complexe (constitué de composés de type flavolignane et flavanone) appelé silymarine. La silymarine a été testée sur un modèle expérimental animal. Il a été démontré qu'elle exerce un effet positif sur les cellules hépatiques endommagées de façon irréversible et sur les hépatocytes intacts. De plus, la silymarine stimule aussi la capacité des cellules hépatiques à la régénération après hépatectomie partielle. Cependant, le mécanisme d'action de la protection apportée par la silymarine n'est pas encore bien élucidé. La quercétine, issue d'*Artemisia scoparia*, a été décrite comme possédant une activité protectrice vis-à-vis de l'hépatotoxicité du paracétamol chez le rat et la souris (Gilani et Janbaz, 1993).

I.4.3. Propriétés anti-allergiques

Les flavonoïdes, notamment la quercétine, la lutéoline, l'apigénine et la fisétine ont de fortes activités anti-allergiques basées principalement sur l'inhibition de la libération d'histamine (Kotani et al., 2000) (Yamamura et al., 1998). L'histamine est responsable chez les personnes allergiques et asthmatiques de symptômes gênants dans une réaction allergique. Ainsi, le rôle des flavonoïdes comme anti-allergique se fait par l'inhibition d'enzymes qui favorisent la libération d'histamine : la phosphodiesterase et la Ca⁺⁺ ATPase (Kotani et al., 2000).

I.4.4. Propriétés anti-inflammatoires

Le mécanisme inflammatoire est déclenché par l'action de médiateurs de l'inflammation produits par les cellules, telles que les cytokines, les eicosanoïdes (Johnson et Fritsche, 2012). Les flavonoïdes inhibent la synthèse et les activités des différents médiateurs inflammatoires ce qui leur confèrent leurs propriétés anti-inflammatoires. La quercétine joue un rôle important dans toutes les situations inflammatoires parce qu'elle inhibe la formation des médiateurs de l'inflammation : les prostaglandines et les leucotriènes (Asongalem et al., 2004).

I.4.5. Propriétés anti-ulcérogènes

Les flavonoïdes jouent un rôle dans la protection de la muqueuse gastrique contre les différents agents ulcérogènes. Par exemple, l'hypolaétine-8- glucose, la quercétine et la naringine ont une activité anti-ulcérogène (Villar et al., 1987). En effet, la quercétine stimule la production de prostaglandines et empêche la production de leucotriènes par la production de mucus protégeant ainsi la paroi stomacale (Martin et al., 1994). De plus, la quercétine est aussi un inhibiteur de croissance d'*Helicobacter pylori* qui est responsable des gastrites chroniques, d'ulcères duodénaux et qui joue aussi un rôle important dans l'apparition des cancers de l'estomac (Shin et al., 2005).

I.4.6. Autres propriétés

En plus des propriétés énoncées précédemment, les flavonoïdes peuvent posséder d'autres propriétés. Les isoflavones sont susceptibles d'affecter les mécanismes responsables du développement de la cataracte diabétique (Stefek, 2011). En effet, Ong et Khoo (2000) ont trouvé que la myricétine présente des effets hypoglycémiant et hypotriglycéridémiant chez les animaux diabétiques. Les flavonoïdes peuvent aussi afficher de multiples effets biochimiques et pharmacologiques qui affectent la fonction du système immunitaire (Middleton & Kandaswami 1992). La quercétine et l'apigénine peuvent jouer un rôle protecteur contre des déficiences immunologiques (Merzoug et al., 2014) (Ginwala et al.,

2016). D'autres flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire de virus tels que le *virus respiratoire syncytial* (VRS), l'*herpès simplex virus* (HSV) et les *adénovirus* (Goncalves et al., 2001) (Serkedjieva et Ivancheva, 1998).

II. Effet des procédés sur les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont stables dans certaines conditions (température faible, absence de lumière pH basique). La modification de leur environnement peut provoquer des dégradations et une perte de leur activité biologique. Toute application d'un procédé engendre des modifications de leur environnement, si celles-ci sont trop drastiques, alors il y aura une dégradation du flavonoïde. Il est alors pertinent d'étudier les effets des procédés sur le devenir des flavonoïdes. Ces procédés peuvent être soit thermiques ou mécaniques. La phase de stockage peut aussi induire des dégradations ainsi que l'ajout d'autres ingrédients (effet de la matrice).

II.1. Effet des procédés thermiques sur la teneur en flavonoïdes

Les procédés thermiques étudiés dans la littérature comprennent des procédés industriels (séchage, pasteurisation, stérilisation) aussi bien que des procédés domestiques (cuisson par ébullition, friture plate,...). Beaucoup de travaux ont porté sur l'effet des procédés sur l'évolution de la teneur en flavonoïdes dans des matrices alimentaires. Cependant, peu de travaux se sont intéressés à l'effet des procédés thermiques sur l'évolution de la teneur en flavonoïdes dans des solutions modèles (sans matrice alimentaire).

II.1.1. Procédés industriels

➤ Effet des procédés thermiques sur la teneur en flavonoïdes totaux

Les études répertoriées portent sur des procédés thermiques, des conditions de chauffage et sur des matrices alimentaires différentes. Ainsi, il est difficile de pouvoir donner des conclusions précises quant à l'effet des procédés thermiques sur la teneur en flavonoïdes totaux dans des matrices alimentaires. Cependant, la plupart des procédés thermiques conduisent à une dégradation des flavonoïdes. La cuisson du céleri en présence d'eau à une température de 50 °C pendant 90 s provoque une perte d'environ 22% en flavonoïdes totaux (Viña et Chaves, 2008). La stérilisation en autoclave du champignon Shiitake à une température de 100 °C durant 15 min entraîne une perte de 25% de la teneur en flavonoïdes (Choi et al., 2006).

Des résultats similaires ont été rapportés avec le chauffage du sarrasin au micro-ondes à 700W pendant 10 min (**Zhang et al., 2010**).

L'intensité de diminution des flavonoïdes totaux par application de procédés thermiques dépend du couple temps, température. **Zhang et al. (2010)** ont montré que lorsque la température et le temps augmentent, la dégradation des flavonoïdes est plus importante. En effet, la torréfaction du sarrasin à une température de 80°C pendant 20 min conduit à une diminution de 20% de la teneur en flavonoïdes, alors que ce pourcentage passe à 33% lorsqu'on double le temps de chauffage à une température de 120°C. La friture des oignons à une température de 180°C pendant 5 min a entraîné une dégradation rapide des flavonols glycosylés à hauteur de 80% (**Ulbrich et al., 2015**). La cuisson des pommes de terre à la vapeur pendant 40 minutes a induit une diminution de 12% de la teneur en flavonoïdes totaux (**Huang et al, 2006**). Les procédés de séchage conduisent également à la dégradation des flavonoïdes et le pourcentage de dégradation dépend de la méthode et du temps de séchage. Par exemple, le séchage des fleurs de l'*Eucommia Ulmoides* par micro-ondes pendant 2 min a entraîné une diminution de moins de 1% de la teneur en flavonoïdes, tandis que le séchage au four à une température de 60°C durant 1h a entraîné une perte de 28% (**Dong et al, 2011**). En revanche, le blanchiment du chou par immersion dans l'eau à une température de 100 °C pendant 4 min n'a pas mené à une dégradation des flavonoïdes (**Viña et al., 2007**). Il a également été signalé que la cuisson au four à une température de 177°C pendant 20 minutes n'a pas modifié la teneur en flavonoïdes du son de blé (**Nayak et al., 2015**).

Parmi les procédés thermiques étudiés, on constate qu'une diminution de la teneur en flavonoïdes est toujours identifiée excepté pour le blanchiment du chou et pour la cuisson du son de blé. Cependant, le pourcentage de dégradation varie en fonction du type de procédés, des conditions de chauffage (température, temps) et de la matrice alimentaire.

➤ **Effet de la température sur la teneur en flavonoïdes individuels**

Certains auteurs ont souhaité observer le comportement des flavonoïdes individuels afin de comparer leur différence de sensibilité à un traitement thermique. Parmi ces études, les flavonoïdes individuels sont soit en solution, soit dans des matrices alimentaires.

• **Dans des matrices alimentaires**

Les flavonoïdes individuels étudiés dépendent de la composition des matrices alimentaires étudiées. Les anthocyanes de sureau sont sensibles à la température. En effet, la teneur en anthocyanes a diminué de 50% après le chauffage à une température de 95°C pendant 3h (**Sadilova et al., 2006**). La rutine dans les grains de sarrasin est plus stable que la vitexine,

l'isovitexine, l'homoorientine et l'orientine, lorsque ces grains sont torréfiés à une température de 160°C durant 30 min (**Zielinski et al., 2009**). Cependant, une augmentation du temps de torréfaction (10-130 min) conduit à des pertes plus importantes de rutine (**Dietrych-Szostak et Oleszek, 1999**). La pasteurisation d'un jus de fraise à une température de 90°C pendant 1 min n'a aucun effet sur la teneur en quercétine et en kaempférol (**Odrizola-Serrano et al., 2008**), alors qu'elle réduit la teneur en naringine, en narirutine, en quercétine et en naringénine dans les jus de pamplemousse (**Igual et al., 2011**) et la teneur en procyanidines dans les pêches en conserve (**Asami et al., 2003**). **Dairi et al. (2015)** ont étudié l'effet de trois traitements thermiques sur la teneur en lutéoline et en apigénine du myrte. Leurs teneurs sont restées stables après un chauffage de 20 minutes par micro-ondes alors qu'ils se sont dégradés durant une opération de torréfaction (235°C, 10 min) et le chauffage au four (180°C, 3h). De plus, il a été constaté que les deux flavonoïdes ont des sensibilités différentes. En effet, l'apigénine est plus stable que la lutéoline, que ce soit durant la friture (68% dégradée de lutéoline, 50% dégradée d'apigénine) ou durant le chauffage à la flamme (70% dégradée pour la lutéoline et 23% pour l'apigénine).

Fuleki et Ricardo-da-Silva (2003) ont montré que la pasteurisation du jus de raisin a conduit à une augmentation de la teneur en catéchines dans les jus pressés à froid, alors qu'elle entraîne une diminution de la teneur de ces flavonoïdes dans les jus pressés à chaud. Le chauffage des haricots brésiliens à des températures de 100°C et de 121°C entraîne une diminution de la teneur en quercétine et en kaempférol (**Ranilla et al., 2009**).

- Dans des solutions modèles

Peu d'études ont examiné l'effet du traitement thermique sur le comportement des flavonoïdes en solution. Les flavonoïdes dans des solutions aqueuses présentent une sensibilité différente à un traitement thermique en fonction de leur structure. Cependant, une dégradation significative est observée à des températures supérieures à 100°C quelle que soit leur structure (**Buchner et al, 2006**). La rutine est plus stable par rapport à sa forme aglycone (la quercétine) au cours d'un traitement thermique à des températures de 90°C et de 100°C pendant 240-300 min (**Buchner et al, 2006**) (**Makris et Rossiter, 2000**). La lutéoline est plus stable que la rutine et la lutéoline-7-glucoside, durant un chauffage à une température de 180°C pendant 180 min (**Murakami et al., 2004**). La dégradation des flavonoïdes ne dépend pas seulement de la température et de la durée du chauffage, il peut dépendre d'autres paramètres tels que le pH (**Rein, 2005**), la présence d'oxygène et la présence d'autres composés phytochimiques dans le milieu. Par exemple, la dégradation de la rutine et de la quercétine est plus élevée dans des conditions réactionnelles basiques et neutres (**Buchner et al., 2006, Friedman, 1997**). La présence d'oxygène a augmenté le pourcentage de dégradation de la quercétine et de la rutine lors d'un chauffage à

une température de 97°C pendant 240 min (**Makris et Rossiter, 2000**). La présence d'autres composés phyto-chimiques dans le milieu comme l'acide chlorogénique joue un rôle protecteur des flavonoïdes (**Murakami et al., 2004**).

II.1.2. Procédés domestiques

L'effet des procédés domestiques sur la teneur en flavonoïdes a été étudié par simulation des conditions de préparation des produits alimentaires à domicile, telles que la cuisson par l'ébullition, la friture, la cuisson au four ou par micro-onde.

Makris et Rossiter (2000) ont montré que la cuisson par l'ébullition pendant 60min conduit à une diminution de la teneur en flavonoïdes, et cette diminution varie en fonction de la matrice alimentaire. En effet, ils ont observé une diminution de 44% dans les asperges et de 20,5% dans les oignons. Des pertes similaires dans les oignons ont été signalées par **Lee et al. (2008)**. **Lombard et al. (2005)** et **Harris et al. (2015)** ont étudié l'effet de la cuisson par l'ébullition pendant 15min sur la teneur en quercétine- 3,4'-diglucoside et en quercétine-4'-glucoside des oignons. Des pertes de 72% et 88% respectivement ont été constatées pour ces deux flavonoïdes. En ce qui concerne un chauffage par les micro-ondes, aucun effet significatif n'a été noté sur la teneur en flavonoïdes des oignons (**Lee et al, 2008**).

La cuisson par la friture (15 minutes) a entraîné une diminution de 29% de la teneur en flavonoïdes des oignons, de 16% pour la quercétine- 3,4'-diglucoside et de 40% pour la quercétine-4'-glucoside des oignons (**Lee et al, 2008**). Cependant, **Juániz et al. (2016)** ont constaté que la friture de l'oignon et du poivre vert dans de l'huile d'olive à une température de 115°C pendant 10min a conduit à une augmentation de la teneur en dérivés de quercétine de 34,55% dans l'oignon et de 27% dans le poivre vert. Ils ont également remarqué une augmentation de 87% de la teneur en dérivés de lutéoline dans le poivre vert.

Ainsi, on a remarqué que la cuisson par les micro-ondes n'induit pas de modifications de la teneur en flavonoïdes, alors que la cuisson par l'ébullition entraîne une diminution de la teneur en flavonoïdes et la cuisson par la friture peut conduire soit à diminuer ou augmenter la teneur en flavonoïdes.

II.1.3. Dégradation des flavonoïdes par microcalorimétrie

La technique de microcalorimétrie a été utilisée par certains auteurs pour simuler un procédé thermique dans des conditions non isothermes. Les effets constatés lors d'un chauffage par la microcalorimétrie varient en fonction de la structure des flavonoïdes. **Ungar et al. (2003)** ont observé que la génistéine est plus stable que la daidzéine (chauffage de 50 à 120°C avec un incrément de 3,8°C/h). **Da Costa et al. (2002)** ont montré que la quercétine est plus sensible à

un traitement thermique que la rutine (chauffage de 25 à 500°C avec un incrément de 10°C/min). **Samper et al. (2012)** ont trouvé que la quercétine était plus stable que la chryisine, l'héspéridine et la naringine pendant un chauffage de 30 à 350°C avec un incrément de 5°C/min.

II.2. Effet des procédés mécaniques sur les flavonoïdes

Les procédés mécaniques tels que le pressage, peuvent être utilisés pour la formulation des produits alimentaires. Quelques études ont permis de connaître les effets des procédés mécaniques sur la teneur en flavonoïdes. Cet effet varie en fonction de la matrice alimentaire et du type de procédé. En effet, **Makris et Rossiter (2001)** ont observé une diminution de 18,5% de la teneur en rutine dans les asperges après une opération de découpage. Cependant, le découpage a conduit à une augmentation de la teneur en flavonols dans les oignons (**Pérez-Gregorio et al., 2011**) et dans les pommes de terre (**Tudela et al., 2002**).

Le pressage à une température de 40°C a conduit à une diminution de 75% de la teneur en anthocyanes dans la myrtille (**Brownmiller et al., 2008**). Cependant, l'augmentation de la température du pressage peut induire une augmentation de la teneur en flavonoïdes. **Gérard et Roberts. (2004)** ont remarqué que l'augmentation de la température de 40°C à 70°C au cours du pressage des pommes permet d'augmenter la teneur en flavonoïdes de 50% dans le jus de pomme. Des résultats similaires ont été trouvés par **Renard et al. (2011)**. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'augmentation de la température de pressage augmente la disponibilité et l'extraction des flavonoïdes de la matrice.

Les résultats concernant d'autres procédés mécaniques comme l'épluchage sont à relativiser car ils correspondent à une diminution de la teneur en flavonoïdes par enlèvement d'une partie du produit. Par exemple, l'enlèvement de la pelure d'oignon conduit à une diminution de 39% de la teneur en flavonoïdes (**Ewald et al., 1999**).

II.3. Effet de la matrice alimentaire sur les flavonoïdes

Les flavonoïdes dans leur matrice alimentaire sont protégés de toute dégradation. Une fois extraits, ils se retrouvent dans un environnement qui ne leur est plus favorable. En effet, les flavonoïdes sont sensibles à une élévation de température, à la présence d'oxygène, de lumière et au pH. De plus, il peut se créer des synergies entre les flavonoïdes et d'autres molécules présentes dans la matrice. En effet, **Murakami et al. (2004)** ont montré que l'acide chlorogénique protège la rutine de la dégradation par le chauffage à une température de 100°C pendant 360 min. De plus, **Sharma et Zhou (2011)** ont étudié la stabilité des catéchines du thé vert au cours du processus de fabrication de biscuits. La stabilité des catéchines a été améliorée

par une augmentation du pH. Ainsi, ils ont souligné les possibles interactions entre les catéchines et les protéines de blé au cours du processus de la fabrication de biscuits. Cependant, **Stahl et al. (2009)** ont observé que le bicarbonate de soude (utilisé dans la formulation des gâteaux) a un effet négatif sur les monomères de flavonols et les procyanidines. En effet, il conduit à une diminution significative de la teneur en flavan-3-ols en raison du pH fortement basique du mélange. Les interactions possibles entre les ingrédients de la matrice alimentaire et les flavonoïdes peuvent être positives (effet protecteur) soit négatives en entraînant la dégradation des flavonoïdes et/ou la diminution de leurs activités biologiques. **Hidalgo et al. (2010)** ont montré que le kaempférol conjugué avec la myricétine a entraîné une synergie positive sur l'activité antioxydante, tandis que la myricétine avec la quercétine a donné lieu à un effet négatif. **Reber et al. (2011)** s'est intéressé aux interactions entre des composés phénoliques contenus dans les fraises (acide p-coumarique PC, cyanidine Cy, catéchine Ca, quercétine-3-glucoside Qu, pélargonidine Pe et de l'acide ellagique EI). La présence de la quercétine-3-glucoside dans un mélange de composés phénoliques conduit à une synergie positive sur l'évolution du pouvoir antioxydant alors que la pélargonidine mène à une synergie négative (tableau 3).

TABEAU 3: SYNERGIES POSITIVES ET NEGATIVES SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES COMBINAISONS DES COMPOSES PHENOLIQUES

Combinaison des composés phénoliques	Synergie
cyanidine et pélagonidine	négative
acide p-coumarique et pélagonidine	
acide p-coumarique et catéchine	positive
acide p-coumarique et quercétine-3-glucoside	
cyanidine et quercétine-3-glucoside	
acide p-coumarique, catéchine et pélagonidine	négative
acide p-coumarique, pélagonidine et quercétine-3-glucoside	positive
cyanidine, pélagonidine et quercétine-3-glucoside	
cyanidine, l'acide ellagique et quercétine-3-glucoside	
quercétine-3-glucoside, l'acide ellagique et acide p-coumarique	
quercétine-3-glucoside, l'acide ellagique et cyanidine	

II.4. Effet de l'environnement physico-chimique sur les flavonoïdes

L'environnement d'un flavonoïde peut être défini comme par l'ensemble des facteurs suivants : température, lumière, oxygène, pH. De plus, ces facteurs sont d'autant plus susceptibles d'être des facteurs de dégradation que les flavonoïdes y sont exposés longtemps. Ainsi le temps d'exposition ou de stockage sera aussi un facteur à étudier.

II.4.1. Effet du temps et de la température de stockage

Dans la totalité des études, une dégradation des flavonoïdes dans les aliments a été trouvée avec l'augmentation du temps et de la température de stockage. Cependant, peu d'études portent sur l'effet dissocié du temps et de la température de stockage.

L'intensité de la dégradation varie en fonction des conditions de stockage et de la matrice alimentaire stockée. Une perte de 47% de la teneur en flavonoïdes totaux a été quantifiée dans le céleri après un stockage de 21 jours à la température de 0°C (**Viña et Chaves, 2008**). Une diminution de 50% de la teneur en flavonoïdes d'un jus d'orange a été observée pendant un stockage de 40 jours à une température de 4°C (**Plaza et al., 2011**). La teneur en anthocyanes dans la grenade est restée stable durant le stockage pendant 13 jours à la température de 1°C (**López-Rubira et al., 2005**), alors que le stockage pendant 6 mois à la température de 25°C a mené à une diminution de 60% de la teneur en anthocyanes dans les compotes de bleuets

(Patras et al., 2010). Fracassetti et al. (2013) ont étudié également l'effet de la température pendant le stockage sur la teneur en anthocyanes dans le bleuet sauvage, ils ont remarqué que le stockage a réduit le contenu des anthocyanes aux températures de 25, 60 et 80°C.

L'effet du stockage sur les flavonoïdes dépend également de la structure des flavonoïdes. Odriozola-Serrano et al. (2008) ont montré que le kaempférol est plus stable que la quercétine et la myricétine après un stockage de 56 jours à une température de 4°C. En effet, le pourcentage de dégradation est de 10% pour le kaempférol et de 50% pour la quercétine, alors que la myricétine a totalement disparu après le stockage. Le stockage de la confiture de framboises pendant 6 mois à une température de 20°C a entraîné une diminution de 40% de la teneur en quercétine 3-glucoside et de 50 % de la teneur en kaempférol 3-glycoside (Zafrilla et al., 2001). Une perte de 35% de la teneur en quercétine conjuguée des oignons a été trouvée après un stockage de 6 mois à une température de 4°C (Price et al., 1997). En revanche, Igual et al. (2013) ont constaté que le stockage de la confiture de pamplemousse pendant 3 mois à une température de 4°C a conduit à une augmentation de la teneur en poncirine. Cette augmentation peut être attribuée à une transformation chimique de la naringine et de la naringenine (Igual et al., 2011).

Les procédés de stockage entraînent le plus souvent une diminution de la teneur en flavonoïdes. Cette diminution dépend de la durée et de la température de stockage, de la nature des flavonoïdes et de la matrice alimentaire stockée.

II.4.2. Effet de la lumière sur les flavonoïdes

L'effet de la lumière sur les flavonoïdes a été étudié avec différents types de lumière.

Les résultats de la littérature ont montré que la teneur en flavonoïdes dans des aliments frais augmente après une exposition à la lumière. Celle-ci induit un signal de stress qui entraîne la synthèse de flavonoïdes (Cisneros-Zevallos, 2003).

Par exposition à la lumière UV (100-400nm), une augmentation de la teneur en flavonoïdes a été constatée de 26% dans les tomates fraîches (7 jours, 4-6°C) (Slimestad et Verheul, 2009), de 50% dans les bleuets (20min, 4°C) (Wang et al. (2009a)) et de 100% dans la laitue (21 jours) (Ouhibi et al., 2014).

Concernant une exposition à la lumière fluorescente, une augmentation de la teneur en flavonoïdes a été répertoriée de 84% dans les pommes de terre (7 jours, 4°C) (Tudela et al, 2002), de 58% dans les oignons fraîchement coupés (16 jours) (Lee et al., 2008) et de 32% (24 h, 25°C) (Pérez-Gregorio et al., 2011). Cependant, Islek et al. (2015) ont observé que la teneur en flavonoïdes dans les oignons a diminué de 45% après un stockage de 21 jours à une

température de 25°C sous une lumière fluorescente. Cette diminution peut être expliquée par le fait l'effet de la lumière est liée à la dose d'irradiation, à la sensibilité tissulaire et à la surexposition. Ces éléments peuvent causer l'appauvrissement des flavonoïdes (**Rodov et al., 2010**). **Islek et al. (2015)** ont étudié l'effet de la lumière sur les oignons frits avec deux conditions d'emballage (de l'azote et du vide). Ils ont observé que les échantillons emballés sous vide sont plus stables que les échantillons emballés sous azote. En effet, la diminution de la teneur en flavonoïdes (21 jours, 25°C) sous lumière fluorescente est moindre de 10% sous vide et de 35% sous azote.

Peu d'études ont porté sur la quantification des flavonoïdes individuels dans une matrice alimentaire après une exposition à la lumière. Le stockage des oignons sous lumière fluorescente pendant 3 semaines à une température de 25°C a conduit à une disparition de la quercétine-3,4'-diglucoside, à une diminution de 90% de la teneur en quercétine-4'-glucoside et à une augmentation de la teneur en quercétine (**Islek et al., 2015**). Cette augmentation est due à la dégradation des quercétines glycosides en quercétine (**Rodrigues et al., 2009**). Des résultats similaires ont été trouvés dans des oignons fraîchement coupés (**Higashio et al., 2007**). **Dall'Acqua et al. (2012)** ont montré que la teneur en quercétine dans une solution d'éthanol reste stable lorsque celle-ci est exposée à un rayonnement UV (0.20-0.30 J/cm² min).

Aramwit et al. (2010) ont étudié l'effet de la lumière sur la teneur en anthocyanes des fruits du mûrier, ils ont trouvé une diminution de façon significative (15%) après l'exposition à une lumière fluorescente pendant 10 h à une température de 25°C, alors que, **López-Rubira et al. (2005)** ont observé que l'exposition à une lumière UV n'a pas eu d'effet sur la teneur en anthocyanes des grenades après 15 jours de stockage à la température de 5°C.

L'effet de la lumière sur les flavonoïdes dépend de différents facteurs comme la longueur d'onde lumineuse, le pH et le solvant. Selon **Tommasini et al. (2004)**, la diminution de la teneur en 3-hydroxyflavone est plus importante dans l'acétonitrile que dans le méthanol pour une longueur d'onde de 343nm.

II.4.3. Effet de l'oxygène sur les flavonoïdes

De nombreuses études ont mis en évidence une sensibilité des flavonoïdes à l'oxygène. En effet, **Makris et Rossiter (2000)** ont montré que la quercétine et la rutine ont une excellente stabilité après 240 min à une température de 97°C dans des conditions anaérobies, alors que, dans des conditions aérobies, les deux flavonols ont été dégradés respectivement de 98% et de 45%. Le même résultat a été trouvé par **Zimeri et Tong (1999)** qui ont observé que la vitesse de dégradation du gallate d'épigallocatechine augmente avec une élévation des concentrations en

oxygène dissous. Des résultats similaires ont été trouvés par **Islek et al. (2015)**, ils ont observé que la dégradation des flavonoïdes dans les oignons est plus importante dans des conditions aérobies (45%) que dans des conditions anaérobies (30%) après un stockage de 21 jours à une température de 25°C sous une lumière fluorescente. De plus, **Cejudo-Bastante et al. (2011)** ont remarqué que la diminution de la teneur en flavonols et flavan-3-ols du vin blanc est plus importante dans les échantillons soumis à un traitement d'hyper-oxygénation (55% et 50%) par rapport aux échantillons non traités (25% et 30%).

D'après les résultats obtenus de la littérature, il a été établi que les dégradations des flavonoïdes durant une période de stockage ou un traitement thermique sont accélérées en présence d'oxygène. De plus, **Smith et al. (2000)** ont remarqué qu'il existe un lien entre la sensibilité des flavonoïdes à l'oxygène et leur structure. Le principal facteur déterminant la photoréactivité des flavonoïdes est le groupement hydroxyle en position 3.

III. Activité anti-oxydante des flavonoïdes

L'activité biologique la plus reconnue et la plus étudiée pour les flavonoïdes est l'activité anti-oxydante.

III.1. Principe

Un antioxydant est défini comme étant une molécule qui retarde, prévient ou élimine les dommages oxydatifs d'une molécule cible (**Halliwell et Gutteridge, 2007**). Les antioxydants permettent de lutter contre les radicaux libres, ces derniers pouvant nuire aux cellules s'ils se trouvent en excès. Les radicaux libres sont des espèces chimiques utiles s'ils sont présents en faible quantité car ils permettent l'élimination des cellules âgées de l'organisme. Toutefois, si les radicaux libres sont trop nombreux, ils induisent un vieillissement accéléré des autres cellules ce qui provoque des dommages aux organismes. Pour éviter ces réactions, les antioxydants peuvent neutraliser les radicaux libres protégeant ainsi nos cellules (**Milbury et Richer, 2008**).

III.2. Relation entre la structure du flavonoïde et son activité anti-oxydante

De nombreuses études ont suggéré la présence d'une relation entre l'activité anti-oxydante des flavonoïdes et leur structure. Ils ont montré que le pouvoir antioxydant des flavonoïdes dépend

essentiellement du nombre et de la position de leurs groupements fonctionnels (**Van Acker et al., 1996**) (**Sroka, 2005**).

Les principaux éléments responsables de l'activité anti-oxydante sont présentés sur la figure 9, il s'agit de :

- (i) la présence d'une fonction catéchol sur le cycle B,
- (ii) la présence d'un motif énone sur le cycle C,
- (iii) Le groupe 3-OH en combinaison avec le motif énone.

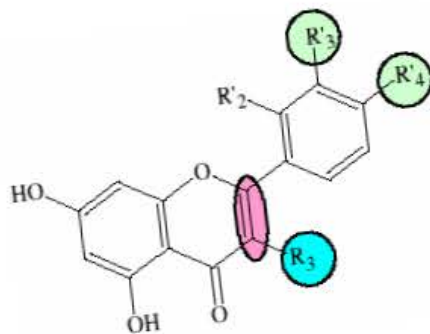


FIGURE 9: LES ELEMENTS STRUCTURAUX RESPONSABLES DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE DES FLAVONOÏDES

1- Importance d'une fonction catéchol sur le cycle B (figure 10) :

La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante. En effet, les hydroxyles donnent leur atome d'hydrogène pour neutraliser les radicaux libres.

La quercétine avec une fonction catéchol sur le cycle B où les deux groupements hydroxyles présentent en positions 3',4' a une activité anti-oxydante plus importante (4,7mM) que le kaempférol (1,34mM) qui ne possède qu'un seul groupement hydroxyle en position 4' et que la morine (2,55mM) avec deux groupements hydroxyles en positions 2',4' (**Rice-Evans et al. 1996**).

2- Importance du motif énone sur le cycle C :

Rice-Evans et al. (1996) ont comparé la capacité anti-oxydante de la quercétine (flavonol) avec celle de la taxifoline (dihydroflavonol). Ils ont trouvé que la présence du motif énone sur le cycle C dans la quercétine a mené à une activité anti-oxydante plus élevée (4,7 mM) par rapport à la taxifoline (1,9 mM). C'est parce que la double liaison entre C2 et C3 permet une délocalisation électronique stabilisante du radical libre (figure 10).

3- Importance du groupement hydroxyle en position 3

Toutes les substitutions comme la glycosylation en position 3 entraînent une diminution de l'activité anti-oxydante (Aliaga and Lissi, 2004). En effet la quercétine glycosylée (la rutine) a une activité anti-oxydante de 2,4 mM alors que son équivalent aglycone (la quercétine) a une activité anti-oxydante de 4,7 mM. Ceci peut être expliqué que la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforce les propriétés antioxydantes des flavonoïdes, parce qu'il permet de délocaliser des électrons (figure 10).

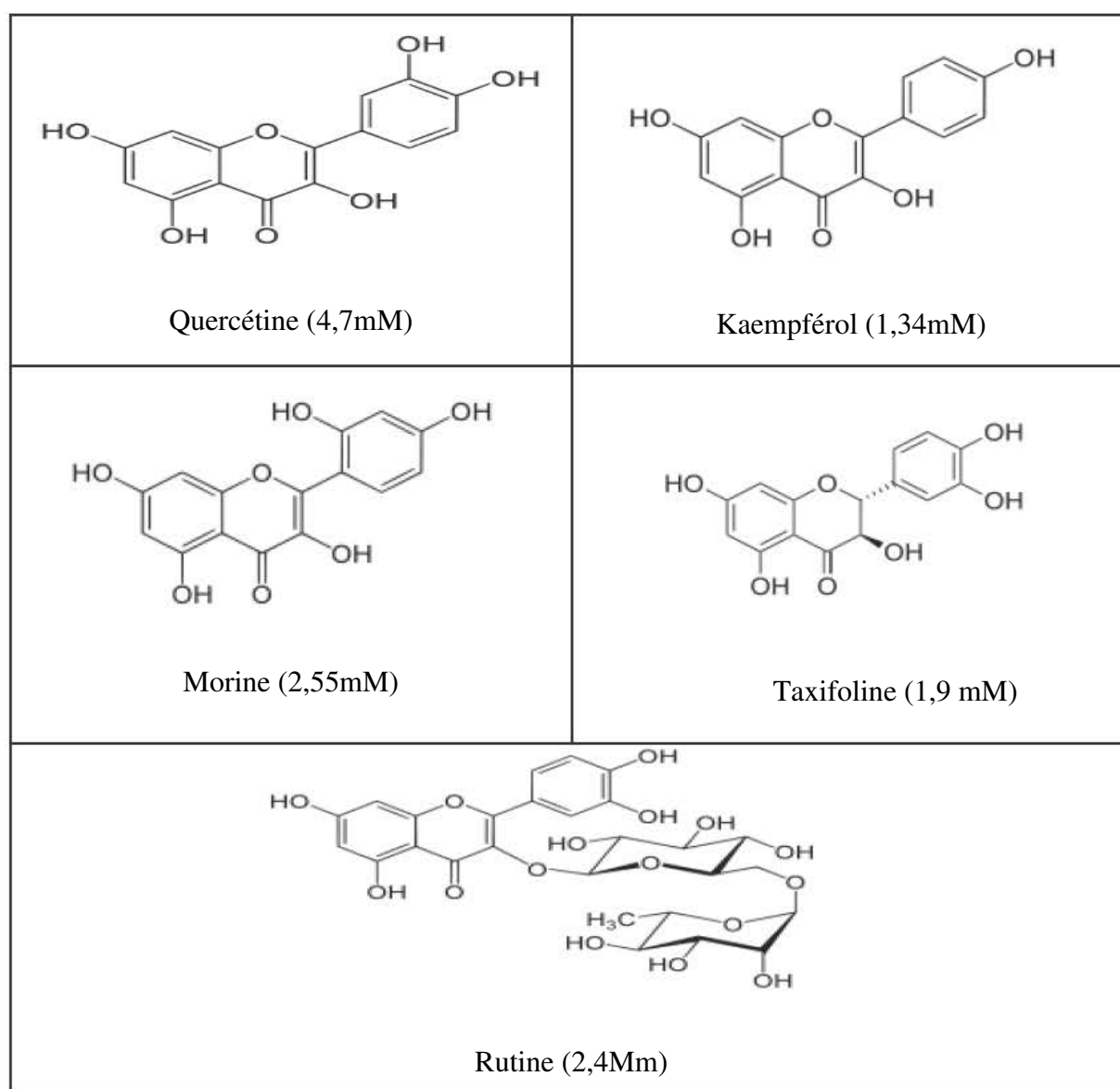


FIGURE 10: STRUCTURE DE FLAVONOÏDES ET LE POUVOIR ANTIOXYDANT (RICE-EVANS ET AL. 1996)

III.3. Mécanismes de Neutralisation des radicaux libres

Les antioxydants peuvent neutraliser les radicaux par deux mécanismes. Le produit final sera le même mais les réactions qui se produisent sont différentes. Les radicaux peuvent être désactivés soit par le transfert d'un atome d'hydrogène (Transfert d'un Atome d'Hydrogène TAH) soit par le transfert d'un électron (Transfert d'Electron TE).

Mode d'action TAH :

Les antioxydants (AH) dans ce système sont capables de neutraliser les radicaux libres en donnant un atome d'hydrogène (équation 1)



X^{\bullet} : Radicaux libres AH : Antioxydant

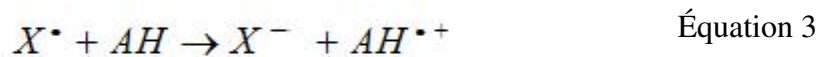
Le radical résultant (A^{\bullet}) est stable, sa stabilité peut s'expliquer par sa conversion en composés non radicalaires en interagissant avec un autre radical selon l'équation 2 (**Hendry et al., 1994**) (**Rolland, 2004**).



A' : Autre radical libre

Mode d'action ET

Dans ce mécanisme, l'antioxydant (AH) réduit les radicaux libres par transfert d'électrons selon l'équation 3.



Les méthodes de mesure de l'activité antioxydante s'appuient sur l'un ou l'autre mécanisme. Une classification a d'ailleurs établi en fonction du mécanisme de neutralisation des radicaux libres.

III.4. Méthodes de mesure l'activité anti-oxydante des flavonoïdes

La détermination de l'activité anti-oxydante est une des méthodes que l'on peut utiliser pour évaluer la qualité biologique et nutritionnelle des aliments (Sochor et al., 2010). La mesure de l'activité anti-oxydante peut se faire soit par évaluation de la capacité de l'antioxydant à piéger les radicaux libres soit par dosage des produits résultants de l'oxydation.

III.4.1. Mesure de l'activité anti-oxydante par évaluation de la capacité de l'anti-oxydante à piéger les radicaux libres

Le mécanisme d'action des molécules anti-oxydantes permet de diviser les méthodes de mesure de l'activité anti-oxydante en deux catégories.

III.4.1.1. Les méthodes basées sur le Transfert d'un Atome d'Hydrogène

Ces méthodes ont pour principe de neutraliser les radicaux libres en leur donnant un atome d'hydrogène (équation 1). Les avantages de ces méthodes sont qu'elles sont indépendantes du pH et très rapide.

- ***Test ORAC (oxygen radical absorbance capacity)***

La méthode ORAC est rapportée comme étant un test pour évaluer la capacité à réduire les radicaux peroxyles (ROO'). Celle-ci a été développée par Glazer (1990). Elle a été conçue avec la B-phycoerythrin (B-PE) comme fluorochrome, elle fut par la suite améliorée en remplaçant la B-PE par de la fluorescéine, un indicateur non protéique et plus stable Ou et al. (2001).

Le test ORAC a été largement utilisé pour mesurer la capacité anti-oxydante d'échantillons biologiques comme le plasma sanguin ou des extraits de fruits et légumes.

Dans cette méthode, les antioxydants sont analysés en utilisant le générateur de radicaux peroxyles l'AAPH (2,2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride) à 37°C. Le pouvoir antioxydant est évalué par la capacité de la molécule à empêcher ou ralentir l'oxydation de la fluorescéine par les radicaux peroxyles. La fluorescence est lue chaque minute pendant 35 min et permet d'obtenir une cinétique de dégradation de la fluorescéine en fonction du temps. Le résultat est donné en μM ou mM d'équivalent Trolox par g de produit ou par ml s'il s'agit d'un liquide (Alam et al., 2012). Cette méthode donne une mesure globale de la capacité antioxydante parce qu'elle combine en une seule mesure le pourcentage d'inhibition de la réaction d'oxydation et la stabilité dans le temps de cette inhibition.

L'avantage majeur du test ORAC est de proposer une mesure standardisée et largement acceptée par la communauté scientifique.

- **Test de β -carotène :**

Ce test utilise un système d'émulsion de lipides dans l'eau (**Frankel et Meyer, 2000**). Dans ce test, une émulsion est préparée contenant du β -carotène et de l'acide linoléique puis elle est solubilisée dans une solution aqueuse. Les antioxydants vont venir se placer au niveau de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la préservation du β -carotène et la prévention de la formation des radicaux lipidiques. Ainsi l'absorbance de la solution est mesurée à 470 nm avec et sans antioxydant pour mesurer l'activité antioxydante (AA) comme suit (équation 4) :

$$AA = (A_{antio\grave{x}l20} - A_{t\acute{e}moinl20}) / (A_{antio\grave{x}0} - A_{t\acute{e}moinl20}) \quad \text{Équation 4}$$

$A_{antio\grave{x}0}$ et $A_{antio\grave{x}l20}$ les absorbances de la solution en présence d'antioxydant à 0 et 120 min
 $A_{t\acute{e}moinl20}$ l'absorbance la solution sans antioxydant à 120 min.

- **Test TRAP : (Total radical trapping antioxidant potential)**

Cette méthode est développée par **Wayner et al. (1985)**. Ce test est souvent utilisé pour déterminer la capacité antioxydante du plasma et du sérum sanguin.

Dans ce test, l'AAPH (2,2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride) est solubilisé avec l'antioxydant et un indicateur (luminol) en milieu aqueux. L'AAPH (2,2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride) génère les radicaux peroxydes et le luminol devient luminescent lorsqu'il est oxydé par les radicaux peroxydes à 37°C. L'oxydation du luminol est suivie en spectroscopie ou par fluorescence. Les antioxydants empêchent l'oxydation du luminol par les radicaux peroxydes issus de l'AAPH. L'activité antioxydante est déterminée comme le temps de consommation de tous les antioxydants et la valeur est comparée à celle du Trolox donnant une valeur TRAP (**Schlesier et al., 2002**).

Cette méthode est relativement longue. L'utilisation de différents indicateurs rend les comparaisons entre les résultats difficiles.

III.4.1.2. Les méthodes basées sur le transfert d'Electron

Ces méthodes s'appuient sur la capacité d'une molécule antioxydante à transférer un électron pour réduire un autre composé tel que les métaux, les carbonyles et les radicaux.

- **Test ABTS•+ (l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)**

Le test ABTS•+ a été développée par **Miller et al. (1993)**. Cette méthode est basée sur la capacité d'une molécule à inhiber le radical ABTS•+. L'obtention du ABTS•+ résulte d'une réaction entre l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) et le persulfate de potassium dans de l'eau. La solution obtenue est une solution bleu foncé. L'activité anti-oxydante d'un composé est mesurée comme la capacité de ce composé à diminuer l'intensité de la coloration. En effet, le radical ABTS•+ en contact avec un donneur d'électron conduit à l'ABTS+ et ainsi à la décoloration de la solution à 734 nm (Figure 11).

Ce test peut être appelé TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) lorsque le trolox est utilisé comme référence.

Ce test est simple et rapide. L'ABTS•+ est soluble dans les solvants organiques et dans les solutions aqueuses (**Moon et Shibamoto, 2009**) il peut donc déterminer le pouvoir antioxydant de molécules lipophiles comme hydrophiles. Ainsi, le radical ABTS est stable sur une large gamme de pH et il peut donc être utilisé pour étudier les effets du pH sur les mécanismes des antioxydants (**Ndhlala et al., 2010**).

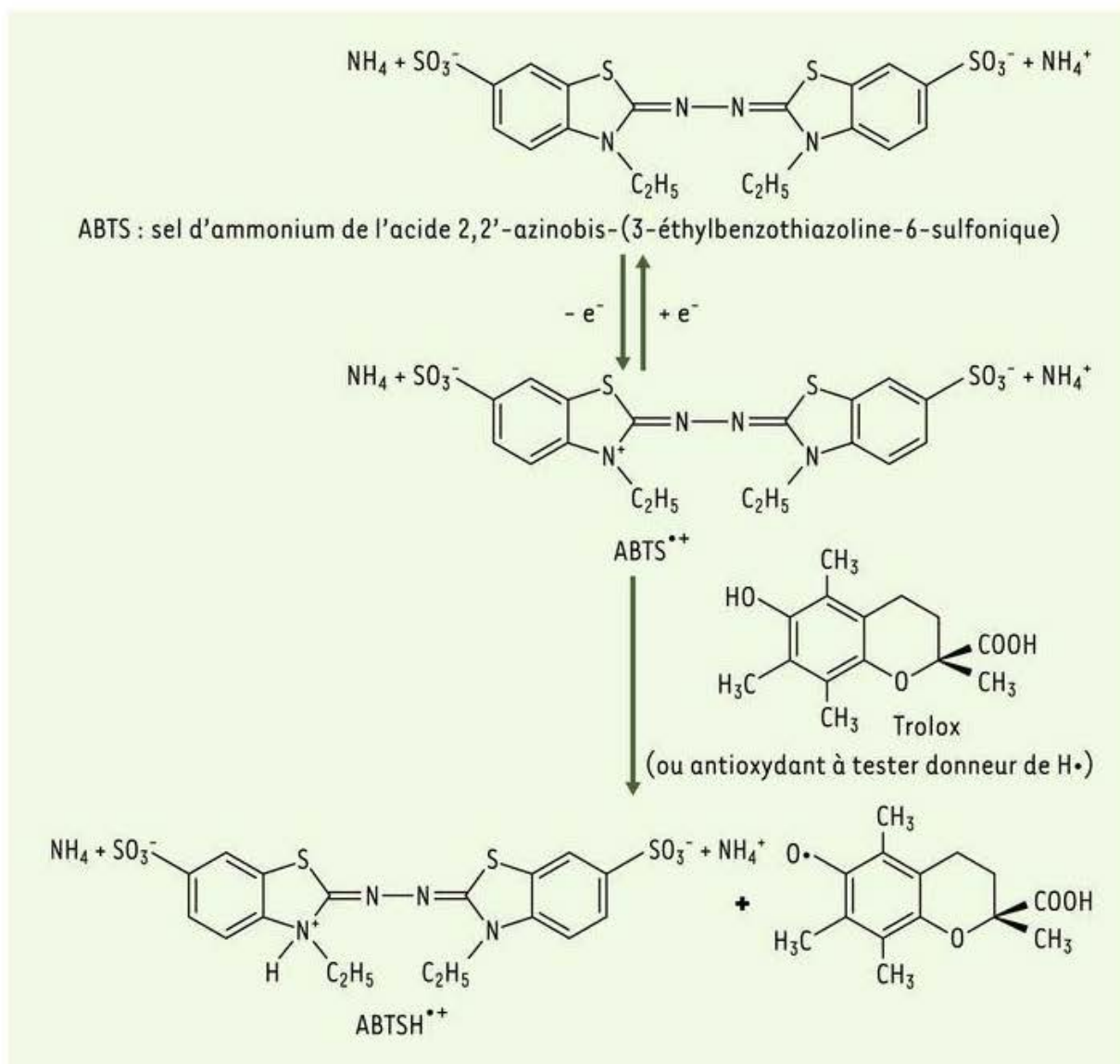


FIGURE 11: FORMATION ET PIEGEAGE DU RADICAL ABTS^{•+} PAR UN ANTIOXYDANT DONNEUR DE H•

- **Test DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)**

Cette méthode est basée sur la capacité d'une molécule à piéger le radical DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Ce radical est l'un des premiers radicaux libres qui ont été utilisés pour déterminer l'activité anti-oxydante des composés (**Blois, 1958**) (**Brand-Williams et al., 1995**). L'activité anti-oxydante d'une molécule est mesurée par sa capacité à donner un électron singulet au DPPH• qui a une couleur violette pour le stabiliser en DPPH (la 2,2-diphényl-1-picryl Hydrazine) qui a une couleur jaune-verte (**Majhenič et al., 2007**). La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette à 515-518 nm.

Ce test est simple et rapide.

- **Test FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)**

Le dosage de FRAP a été réalisé selon la méthode de **Benzie et Strain (1996)**.

Le test est basé sur la capacité d'une molécule à réduire l'ion ferrique (Fe³⁺) en fer (Fe²⁺) à faible pH. Ceci provoque la formation d'un complexe bleu ferreux-triipyridyltriazine (Fe²⁺ - TPTZ), le pouvoir antioxydant d'un composé est déterminé par mesure de l'intensité de la couleur bleue à 593 nm (**Ou et al., 2001**). La méthode FRAP est simple à utiliser et rapide.

- **Test CUPRAC (Cupric ion Reducing antioxidant capacity)**

Cette méthode est similaire à la méthode précédente (FRAP) avec l'utilisation de cuivre au lieu du fer. Le principe de ce test se base sur l'aptitude d'une molécule à la réduction de Cu (II) avec une coloration bleue en Cu (I) avec une coloration jaune-orangé. Le pouvoir antioxydant d'une molécule est mesuré par la diminution de la coloration bleue à 450 nm (**Apak et al., 2004**). Le réactif de CUPRAC est plus stable que d'autres radicaux tels que DPPH, ABTS (**Özyürek et al., 2011**).

III.4.2. Mesure de l'activité anti-oxydante par dosage des produits résultants de l'oxydation

Ces méthodes mesurent certains groupements fonctionnels dans les produits résultants de l'oxydation. Donc, elles nécessitent une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation. (**Krings, 2000**) ont évalué les peroxydes résultants de l'oxydation. Les hydroperoxydes formés après l'oxydation sont mesurés par **Yen. (2000)**. Ainsi **Osawa et Namiki (1981)** ont déterminé les dérivés carbonylés résultants de l'oxydation.

L'activité anti-oxydante dans ces méthodes est calculée par l'équation 5 :

$$\text{IR (\%)} = [(a-b) / (a-c)] \times 100 \qquad \text{Équation 5}$$

Où, a est la concentration en dérivés oxydés sans antioxydant, b la concentration en dérivés oxydés en présence de l'antioxydant à tester après incubation, et c la concentration en dérivés oxydés sans antioxydant avant incubation.

III.5. Effet des procédés thermiques sur l'activité anti-oxydante des flavonoïdes

Lors de l'application d'un procédé thermique, il est important de mesurer la dégradation des flavonoïdes mais aussi l'évolution de leurs activités biologiques et tout particulièrement de leur activité anti-oxydante.

Très peu d'études portent sur l'étude de l'effet des procédés thermiques sur l'activité anti-oxydante d'une solution de flavonoïdes. **Murakami et al. (2004)** ont trouvé que le chauffage de la rutine et de la lutéoline 7-O glucoside à une température de 100°C durant 360 min conduit à une diminution de 15% de l'activité anti-oxydante des flavonoïdes avec une diminution de la teneur en rutine et lutéoline 7-O glucoside de respectivement 22% et 16%. Cependant, **Buchner et al. (2006)** ont remarqué que l'activité anti-oxydante était toujours présente dans une solution de quercétine après un traitement thermique à une température de 100°C durant 240 min, bien que la quercétine ait totalement disparue. **(Lou et al., 2015)** ont constaté que l'activité anti-oxydante du kumquat séché (température de séchage de 130°C, 30 minutes) a doublé avec une augmentation de la teneur en flavonoïdes de 20%. Le tableau 4 présente une synthèse des travaux portant sur l'évaluation du pouvoir antioxydant après un traitement thermique.

TABLEAU 4: POUVOIR ANTIOXYDANT ET TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES APRES LES TRAITEMENTS THERMIQUES

Matrice	Conditions du traitement thermique	Teneur en composés phénoliques	Pouvoir antioxydant	Référence
poivrons vert et rouge	friture (180°C-5 min)	Ne change pas	Ne change pas	Chuah et al. (2008)
	micro-ondes (500W-5 min)			
sorgo	Cuisson (121°C -25 min)	Diminuation de 10%	Augmentation de 16%	Cardoso et al. (2015)
feuilles vertes de poireau	étuvage de 30min	Diminuation de 20%	Augmentation de 20%	Bernaert et al. (2014)
cardon	Friture dans de l'huile de tournesol (115°C -10 min)	Augmentation de 25%	Augmentation de 20%	Juániz et al. (2016)
écorces d'agrumes	Chauffage (100°C – 60 min)	Augmentation de 43%	Augmentation de 13%	Jeong et al. (2004)

D'après l'observation du tableau 4, on constate soit (i) une activité anti-oxydante constante avec une non dégradation des molécules anti-oxydantes, soit (ii) une augmentation de l'activité anti-oxydante avec une diminution de la teneur en composés phénoliques. Cette augmentation étant certainement due aux produits de dégradation des composés phénoliques générés pendant le traitement thermique.

III.6. Effet des procédés de stockage sur l'activité anti-oxydante des flavonoïdes

Peu d'études ont porté sur l'effet du stockage sur l'activité anti-oxydante de matrice alimentaire contenant des flavonoïdes. Les résultats de ces études sont contradictoires. En effet, **Wang et al. (2009a et 2009b)** ont trouvé que l'activité anti-oxydante des bleuets a augmenté pendant un stockage (4 jours, 24°C, présence de lumière). Cependant, **Aramwit et al. (2010)** ont constaté une diminution de l'activité anti-oxydante des mûriers après une exposition à une lumière fluorescente pendant 10 h. **López-Rubira et al. (2005)** n'ont noté aucun effet sur l'activité anti-oxydante de la grenade lors de son exposition aux UV-C pendant 5 jours à la température de 5°C. Des résultats similaires ont été trouvés par **Fracassetti et al. (2013)** qui ont observé une

activité anti-oxydante du bleuet sauvage constante après un stockage à l'obscurité durant 50 jours à une température de 25°C.

Trop peu de travaux ont étudié l'évolution de l'activité anti-oxydante durant le stockage pour pouvoir émettre des conclusions pertinentes.

III.7. Modélisation de l'évolution de l'activité anti-oxydante des flavonoïdes

Peu d'études ont porté sur la modélisation de l'évolution de l'activité anti-oxydante tout au long de la période de stockage. **Zheng et Lu (2011)** ont comparé les modèles cinétiques pour l'évolution de l'activité anti-oxydante de jus d'ananas pendant le stockage à l'obscurité à différentes températures (5-15-25-35 et 45°C) durant 72 heures. Les modèles les plus adéquats sont des modèles du premier ordre et de Weibull (**Alighourchi et Barzegar, 2009**). Il est difficile de modéliser l'évolution de l'activité anti-oxydante car les produits de dégradation des flavonoïdes ont aussi une activité anti-oxydante ainsi il n'existe pas de corrélations entre la teneur en flavonoïdes et l'évolution de l'activité anti-oxydante durant le stockage (**Odriozola-Serrano et al, 2009**) (**Zheng et Lu, 2011**).

IV. Détermination de la teneur en flavonoïdes

IV.1. Méthodes de mesure

La plupart des études quantifiant la teneur en flavonoïdes utilisent la chromatographie liquide à haute pression (CLHP). Une colonne de type C18 est toujours utilisée mais on retrouve une diversité de phases mobiles (tableau 5). Les flavonoïdes sont identifiés grâce à leur temps de rétention et leur spectre UV, ceux-ci étant connus grâce à l'utilisation de molécules étalon. La teneur en flavonoïdes est calculée grâce aux aires des pics et des courbes d'étalonnage obtenues avec les molécules étalon.

Les résultats de teneur en flavonoïdes sont exprimés soit en concentration ou en pourcentage par rapport à la quantité initiale (équation 6).

$$\text{Teneur résiduelle} = (C_t/C_o) \cdot 100 \quad \text{Équation 6}$$

Où C_o est la teneur initiale en flavonoïdes et C_t est la teneur en flavonoïdes après t minutes de traitement.

TABEAU 5: LES PARAMETRES CLHP POUR L'IDENTIFICATION ET LA QUANTIFICATION DES FLAVONOÏDES

Référence	Phase mobile	Unité
Ulbrich et al. (2015)	A : eau / acide acétique (99.5 :0.5 v/v) B : acétonitrile	mM
Qiao et al. (2014)	A : 0,1% d'acide formique aqueux B : méthanol	µg/ml
Dietrych-Szostak et Oleszek. (1999)	A : 1% d'acide phosphorique B : 40% d'acétonitrile dans 1% d'acide phosphorique	mg/100g
Asami et al. (2003)	A : chlorure de méthylène / méthanol / eau / acide acétique (82 : 14: 2: 2 v / v) B : methanol / eau / acide acétique (96: 2: 2 v / v)	mg/kg
Buchner et al. (2006)	A : aide d'acétonitrile B : acide acétique	%
Plaza et al. (2011)	A : methanol / eau (75:25) B : acétonitrile / dichlorométhane / méthanol (70: 5: 25)	mg/100ml

IV.2. Modélisation des cinétiques de dégradation des flavonoïdes

La plupart des études de modélisation sur la dégradation des flavonoïdes ont porté sur les anthocyanes sous l'effet de la température (**Patras et al., 2010**). Les études présentant la modélisation des cinétiques de dégradation ont été divisées en deux parties : les études portant sur des températures faibles simulant des températures de stockage (4-37°C) et les études portant sur des températures élevées correspondant à un traitement thermique (60-180°C) (tableaux 6-7-8) (**Ioannou et al., 2012**).

TABEAU 6: MODELISATION DES CINETIQUES DE DEGRADATION DES ANTHOCYANES PENDANT LE STOCKAGE

Produit alimentaire	Conditions de stockage	Ordre cinétique	Modèle mathématique	Paramètres cinétiques	Références
Jus de grenade pasteurisé	(4, 20 et 37 °C) pendant 210 jours	Premier ordre $C_t = C_0 e^{-kt}$	Modèle d'Arrhenius	$k_{4^{\circ}C} = -6.72 \times 10^{-8} s^{-1}$ $t_{1/2(4^{\circ}C)} = 10.31 \times 10^{-6} s$ $k_{20^{\circ}C} = -1.78 \times 10^{-7} s^{-1}$ $t_{1/2(20^{\circ}C)} = 3.89 \times 10^{-6} s$ $k_{37^{\circ}C} = -3.16 \times 10^{-7} s^{-1}$ $t_{1/2(37^{\circ}C)} = 2.19 \times 10^{-6} s$	(Alighourchi et Barzegar, 2009)
Fraises fraîches coupées	(5,10, 15 et 20 °C) durant 21 jours	Ordre zéro $C_t = C_0 + k_t$	$\ln k = \ln k_0 - \frac{Ea}{RT}$	$k_{5^{\circ}C} = (9.37 \pm 6.71) \times 10^{-6} s^{-1}$ $k_{15^{\circ}C} = (2.78 \pm 0.09) \times 10^{-5} s^{-1}$ $k_{10^{\circ}C} = (1.39 \pm 0.05) \times 10^{-5} s^{-1}$ $k_{20^{\circ}C} = (3.35 \pm 0.09) \times 10^{-5} s^{-1}$	
		Premier ordre		$k_{5^{\circ}C} = (1.01 \pm 0.07) \times 10^{-7} s^{-1}$ $k_{15^{\circ}C} = (3.36 \pm 0.16) \times 10^{-7} s^{-1}$ $k_{10^{\circ}C} = (1.50 \pm 0.07) \times 10^{-7} s^{-1}$ $k_{20^{\circ}C} = (4.51 \pm 0.18) \times 10^{-5} s^{-1}$	
			Modèle d'Weibull $C_t = C_0 e\left[-(tk_{\alpha})^{\beta}\right]$	$k_{\alpha(5^{\circ}C)} = (5.09 \pm 2.43) \times 10^{-8} s^{-1}$ $\beta = 7.5 \times 10^{-1} \pm 1.4 \times 10^{-1}$ $k_{\alpha(10^{\circ}C)} = (2.20 \pm 0.28) \times 10^{-7} s^{-1}$ $\beta = 1.3 \pm 9.2 \times 10^{-2}$ $k_{\alpha(15^{\circ}C)} = (4.05 \pm 0.40) \times 10^{-7} s^{-1}$ $\beta = 1.2 \pm 1.0 \times 10^{-1}$ $k_{\alpha(20^{\circ}C)} = (5.09 \pm 0.21) \times 10^{-7} s^{-1}$ $\beta = 1.8 \pm 8.1 \times 10^{-2}$	
Concentré de mûre (65°Brix)	(5, 25 et 37°C) Durant 60 jours	Premier ordre	Modèle d'Arrhenius	$k_{5-37^{\circ}C} = 3.33 \times 10^{-5} - 9.85 \times 10^{-4} s^{-1}$ Ea= 75.5 kJ/mol $t_{1/2(5-37^{\circ}C)} = 1.19 \times 10^{-6} - 0.04 \times 10^{-6} s$	(Wang et Xu, 2007)
Concentré d'orange sanguine (45 et 69°Brix)	(5, 20 et 37°C) Durant 60 jours	Premier ordre	Modèle d'Arrhenius	$t_{1/2(5,20et37^{\circ}C)} = 200.52 \times 10^{-3} - 7.56 \times 10^{-3} s$ (45°C Brix) $t_{1/2(5,20et37^{\circ}C)} = 416.52 \times 10^{-3} - 11.16 \times 10^{-3} s$ (69°C Brix) Ea = 73.2–89.5 kJ/mol	(Kırca et Cemeroglu, 2003)

TABEAU 7: MODELISATION DES CINETIQUES DE DEGRADATION DES ANTHOCYANES PENDANT LE TRAITEMENT THERMIQUE

Produit alimentaire	Conditions de chauffage		Ordre cinétique	Modèle mathématique	Paramètres cinétiques	Références
Extraits de Roselle	(30-90°C) pendant 300min		Premier ordre	Modèle d'Arrhenius	$E_a = 66 \text{ kJ/mol}$	(Cisse et al.,2009)
Jus de mûre				Modèle d'Eyring	$E_a = 37 \text{ kJ/mol}$	
				Modèle de Ball	$E_a = 47-61 \text{ kJ/mol}$	
Extraits de Roselle	(60-100°C) pendant 120min		Premier ordre	Modèle d'Arrhenius	$k_{60^\circ C} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $k_{90^\circ C} = 6.00 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ $k_{70^\circ C} = 1.67 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $k_{100^\circ C} = 1.32 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ $k_{80^\circ C} = 2.67 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $E_a = 66.22 \text{ kJ/mol}$	(Aurelio et al., 2007)
Jus de cassis	(4-100 ° C) pendant 30min		Premier ordre	Modèle d'Arrhenius	$k_{4^\circ C} = (2.67 \pm 0.17) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $E_a = 73 \pm 2 \text{ kJ/mol}$ $t_{1/2(4^\circ C)} = (15.55 \pm 0.95) \times 10^{-6} \text{ s}$	(Harbourne et al., 2008)
Extrait de maïs	(70, 80 et 90 ° C) pendant 5 h		Premier ordre	Modèle d'Arrhenius	$k_{70^\circ C} = 1.65 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $k_{90^\circ C} = 2.57 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $k_{80^\circ C} = 2.04 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $E_a = 18.3 \text{ kJ/mol}$	(Yang et al., 2008)
Jus de mûre	(60, 70, 80 et 90°C) durant 160min		Premier ordre	Modèle d'Arrhenius	$k_{60-90^\circ C} = 1.15 \times 10^{-5} - 6.57 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $E_a = 58.95 \text{ kJ/mol}$	(Wang et Xu, 2007)
Extraits de Roselle	(55, 70, 85 et 98°C) durant 6h		Premier ordre	Modèle d'Arrhenius	$k_{55^\circ C} = (7.58 \pm 0.019) \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ $k_{85^\circ C} = (4.89 \pm 0.12) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $k_{70^\circ C} = (2.06 \pm 0.03) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $k_{98^\circ C} = (8.51 \pm 0.77) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $E_a = 55.59-63.12 \text{ kJ/mol}$	(Gradinaru et al., 2003)
Jus d'orange sanguine	(70, 80 et 90°C) durant 120min		Premier ordre	Modèle d'Arrhenius	$t_{1/2(70-90^\circ C)} = 22.680 - 5400s$	(Kirca et Cemeroglu, 2003)
Concentrés d'orange sanguine (45 et 69°Brix)					$t_{1/2(70-90^\circ C)} = 12.240 - 2520s \quad (45^\circ \text{Brix})$ $t_{1/2(70-90^\circ C)} = 7200 - 1440s \quad (69^\circ \text{Brix})$	
Pâte de fraise	(95-130°C) pendant 50min		Premier ordre	Modèle d'Arrhenius	$E_a = 94.4 \pm 2.54 \text{ kJ/mol}$	(Verbeyst et al., 2010)
Jus de framboise		(100-140°C)	Premier ordre		$E_a = 92 \text{ kJ/mol}$	(Jiménez et al., 2010)

	Méthode non isotherme	(140-180°C)	Modèle dérivé d'Arrhenius	Ea = 44 kJ/mol	$k_{140^{\circ}C} = 3.5 \times 10^{-3} s^{-1}$	(Harbourne et al. 2008)
Jus de cassis		(110-140°C)		Ea = 91.09 kJ/mol	$k_{140^{\circ}C} = (2.76 \pm 1.11) \times 10^{-6} s^{-1}$	

TABEAU 8: MODELISATION DES CINETIQUES DE DEGRADATION DE LA QUERCETINE ET SES DERIVES

Molécule	Produit alimentaire / solution	Conditions de traitement	Ordre cinétique	Modèle mathématique	Paramètres cinétiques	Références
Quercétine	Éthanol	Stockage à (22, 37 et 60 °C) pendant 120 jours	Ordre zéro	Modèle d'Arrhenius	$k_{22^{\circ}C} = 1.04 \times 10^{-7} s^{-1}$ $k_{37^{\circ}C} = 2.20 \times 10^{-7} s^{-1}$ $k_{60^{\circ}C} = 4.30 \times 10^{-9} s^{-1}$ Ea= 80.9 kJ/mol	(Pinelo et al., 2004)
	Méthanol				$k_{22^{\circ}C} = 4.63 \times 10^{-8} s^{-1}$ $k_{37^{\circ}C} = 1.04 \times 10^{-7} s^{-1}$ $k_{60^{\circ}C} = 4.63 \times 10^{-6} s^{-1}$ Ea= 100.0 kJ/mol	
	Éthanol 10% dans l'eau				$k_{22^{\circ}C} = -1.04 \times 10^{-7} s^{-1}$ $k_{37^{\circ}C} = -1.62 \times 10^{-7} s^{-1}$ $k_{60^{\circ}C} = -3.24 \times 10^{-7} s^{-1}$ Ea = 24.7 kJ/mol	
Quercétine-3-glucoside	Cerise séchée	Chauffage à (80, 90, 100,110 et 120°C) pendant 50min	Premier ordre	Modèle d'Arrhenius	$k_{80^{\circ}C} = (2.5 \pm 0.1) \times 10^{-4} s^{-1}$ $k_{90^{\circ}C} = (2.5 \pm 0.1) \times 10^{-4} s^{-1}$ $k_{100^{\circ}C} = (3.3 \pm 0.1) \times 10^{-4} s^{-1}$ $k_{110^{\circ}C} = (4 \pm 0.2) \times 10^{-4} s^{-1}$ $k_{120^{\circ}C} = (4.3 \pm 0.1) \times 10^{-4} s^{-1}$ Ea = 18.1±0.2 kJ/mol	(Zoric et al., 2014)

Toutes les cinétiques de dégradation des anthocyanes ainsi que pour la quercétine-3-glucoside ont été modélisées par une réaction du premier ordre (équation 7).

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad \text{Équation 7}$$

C_0 , la concentration initiale ($t = 0$)

C , la concentration à temps t (min)

k , le coefficient de vitesse

Seule la cinétique de dégradation de la quercétine a été modélisée par une réaction d'ordre zéro (équation 8) (Pinelo et al., 2004 , Zoric et al., 2014).

$$C_t = C_0 + k_t \quad \text{Équation 8}$$

Le temps de demi-vie est calculé suivant l'équation 9 :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Équation 9}$$

Les paramètres cinétiques (constantes de vitesse et temps de demi-vie) calculés après modélisation diffèrent selon la température de traitement et selon la matrice alimentaire étudiée (Alighourchi et Barzegar, 2009) (Kirca et Cemeroglu, 2003). En effet, une augmentation de la température de traitement conduit à une augmentation des constantes de vitesse de dégradation des flavonoïdes (Zoric et al., 2014) (Aurelio et al., 2007) (Kirca et Cemeroglu, 2003).

Certains auteurs considèrent que, pour des températures de traitement inférieures à 100°C, les méthodes de modélisation isothermes peuvent être utilisées pour estimer la cinétique de dégradation. Dans ce cas, l'équation d'Arrhenius (équation 10) est utilisée pour modéliser la dépendance entre les constantes de vitesse de dégradation et la température à l'exception d'Odriozola-Serrano et al. (2009) qui ont montré que les cinétiques de dégradation des anthocyanes pendant le stockage suivent un modèle basé sur la distribution de Weibull.

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad \text{Équation 10}$$

T , la température en Kelvin

R , la constante des gaz parfaits (valeur usuelle $R = 8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)

E_a , l'énergie d'activation d'Arrhenius donnée en kJ.mol^{-1}

Cependant, pour des températures supérieures à 100°C, certains auteurs ont adapté la loi d'Arrhénius à des conditions non isothermes. Le coefficient de l'équation d'Arrhenius est converti en un paramètre dépendant du couple temps-température (équation 11-12) (**Harbourne et al, 2008**) (**Jiménez et al, 2010**).

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -k_t * \beta \quad \text{Équation 11}$$

$$\beta = \int_0^t \exp\left[\frac{-Ea}{R} \left(\frac{1}{T_t} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right] \quad \text{Équation 12}$$

Où T ref est la température de référence arbitraire et T est la température à l'instant t.

Les énergies d'activation pour la dégradation des anthocyanes varient de 73,2 à 89,5 kJ/mol (**Kirca et Cemeroglu, 2003**) (**Wang et Xu, 2007**) en fonction du degré brix du produit alimentaire. Pour des températures similaires, l'énergie d'activation de la quercétine a été déterminée (**Pinelo et al, 2004**). Celle-ci dépend du solvant utilisé, elle vaut 80,9 kJ/mol dans de l'éthanol, 100 kJ/mol dans du méthanol et 24,7 kJ/mol dans un mélange eau/éthanol (90/10).

Cisse et al. (2009) ont utilisé trois modèles pour la modélisation des cinétiques de dégradation : le modèle d'Arrhenius, le modèle de Ball (utilisé pour la destruction des micro-organismes) et le modèle d'Eyring (basé sur des paramètres thermodynamiques). Des résultats similaires ont été trouvés pour les trois modèles en termes de précision sur les paramètres cinétiques.

Au cours d'un traitement thermique, l'énergie d'activation est plus élevée pour des gammes de températures supérieures à 100°C.

Les valeurs de l'énergie d'activation sont environ de 92 kJ/mol, alors que pour des gammes de températures inférieures à 100°C, l'énergie d'activation est d'environ 60 kJ/mol (**Yang et al., 2008**).

V. Identification des produits de dégradation des flavonoïdes

L'identification de la structure des produits de dégradation est peu abordée dans la littérature. En effet, d'une part les produits de dégradation sont assez instables (**Tommasini et al., 2004**) (**Buchner et al., 2006**) (**Ulbrich et al., 2015**) et d'autre part, ils sont parfois présents en faibles quantités ce qui rend l'utilisation de certaines techniques (RMN, IR) pour leur identification difficile. Pourtant, il semble primordial des identifier pour connaître les propriétés des nouvelles molécules générées dans le milieu tel que leur toxicité. De plus, il a été montré que pour certains flavonoïdes (la quercétine et la rutine) les produits de dégradation avaient un pouvoir antioxydant non négligeable (**Buchner et al., 2006**).

La majorité des études sur les produits de dégradation des flavonoïdes ont porté sur la quercétine. Le tableau 9 résume l'ensemble des travaux portant sur la quercétine.

TABEAU 9: PRODUITS DE DEGRADATION DE LA QUERCETINE

Auteur	Flavonoïde natif	Solvant	Conditions de la dégradation	Technique utilisée	Produits de dégradation
Buchner et al., (2006)	Quercétine	Solution aqueuse	100°C-300 min	CHLP-SM	*2,3-dihydroxy-(3', 4'-dihydroxyphenyl)-prop-2-en-1-al * Acide protocatéchuique *2,5,7,3',4'-pentahydroxy-3,4-flavandione *2-(3', 4'-dihydroxyphenyl)-3,3,5,7-tetrahydroxy-2-methoxy-2,3-dihydrochromen-4-on * 2,2,5,7-tetrahydroxybenzofuran-3-on * 2-(3'-methoxy-4-hydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-3-methoxy-2,3-dihydrochromene-4-on -4-on
Zenkevich et al. (2007)	Quercétine	Eau 30%- éthanol 70%	25°C – 7 jours	CPG-SM	*Acide benzoïque 4,6-dihydroxy-2- (3,4 dihydroxybenzoyloxy)
Zhou et al. (2007)	Quercétine	Ethanol	25°C- 15min	CHLP-SM	* Acide protocatéchuique * Acide gallique
Ramesova et al. (2012)	Quercétine	Méthanol	25°C – 50 min	CHLP-SM	* 2- (3', 4'-dihydroxybenzoyl) -2,4,6-trihydroxybenzofuran-3 (2H) -one *2- (3,4-dihydroxyphényl) -2-oxoacétique *Acide 2,4,6-trihydroxybenzoïque * Acide protocatéchuique
Ulbrich et al., (2015)	Quercétine- 3,4'- diglucoside	Méthanol	180°C -5min	CHLP	*Quercétine-4'-glucoside *Quercétine

Buchner et al. (2006) ont étudié le traitement thermique (100°C, 300 min) de la quercétine et de la rutine en solution aqueuse. La caractérisation des produits de dégradation obtenus s'est fait par utilisation de la chromatographie liquide CLHP couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM). Les temps de rétention et les masses molaires des composés détectés par CLHP-SM ont permis d'identifier l'acide protocatéchi que comme produit de dégradation de la quercétine, **Ramesova et al. (2012)** ont étudié l'effet de l'oxygène sur la quercétine. En effet, ils ont trouvé que l'exposition de la quercétine à l'oxygène atmosphérique pendant 50 min, a conduit à une disparation totale de la quercétine et à la formation de 4 produits de dégradation (l'acide protocatéchi que, l'acide 2,4,6-trihydroxybenzoïque, (3', 4'-dihydroxybenzoyl) -2,4,6 trihydroxybenzofuran-3 (2H) -one, 2- (3,4-dihydroxyphényl) -2-oxoacétique).

Buchner et al., (2006) ont réussi à identifier le mécanisme de dégradation de la quercétine dans des solutions aqueuses basiques (figure 12). Cependant, ils n'ont pas pu aboutir à des résultats quant aux produits de dégradation de la rutine, la forme glycosylée de la quercétine.

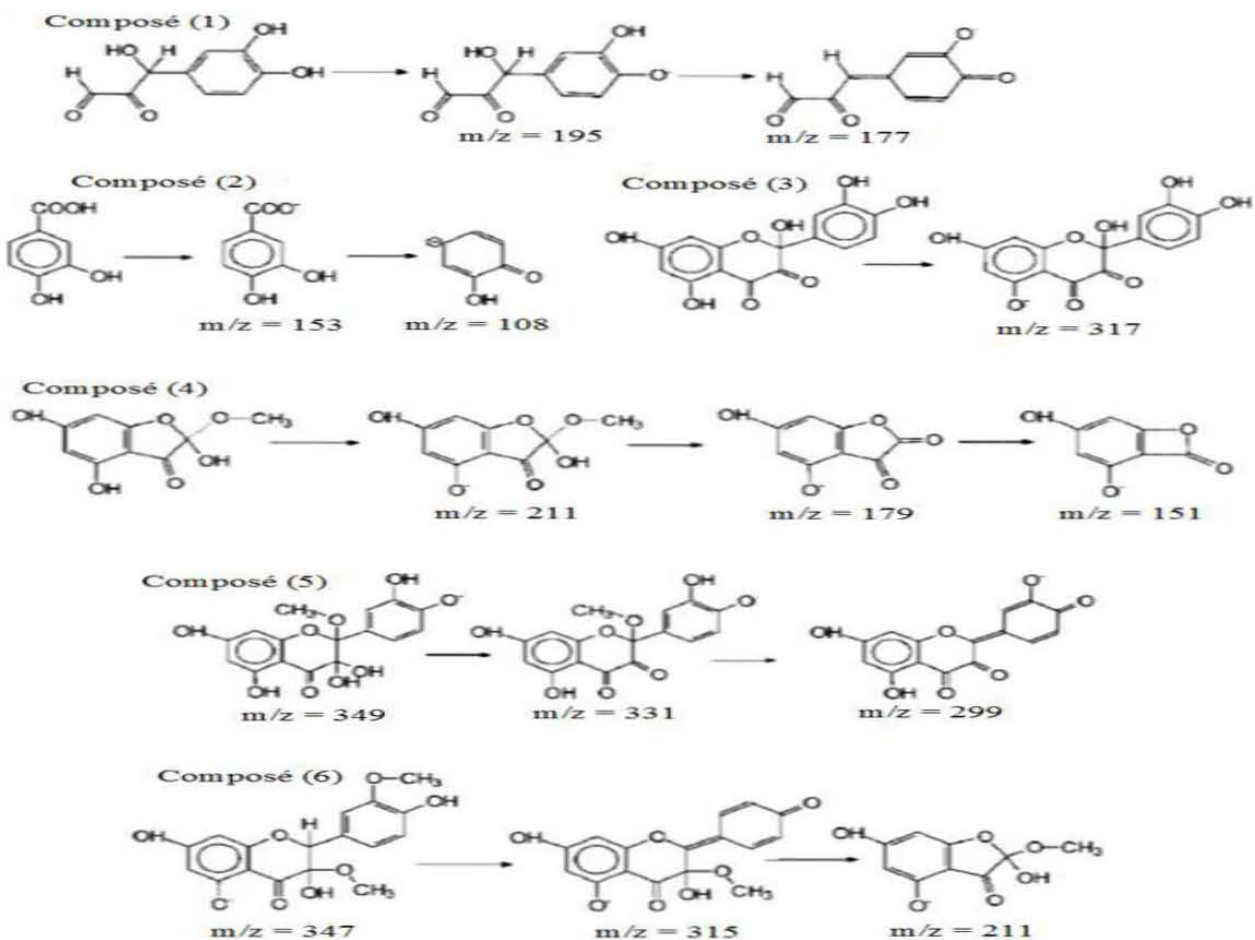


FIGURE 12: SCHEMA DE FRAGMENTATION DES PRODUITS DE DEGRADATION DE LA QUERCÉTINE (BUCHNER ET AL., 2006)

La figure 12 donne un aperçu des mécanismes de fragmentation de quercétine postulés. En effet, sur la base des expériences ESI-MSⁿ et de la connaissance du mécanisme de fragmentation de la quercétine (obtenue à partir des données MSⁿ), les structures des produits de dégradation du quercétine ont été proposées.

La figure 13 illustre les différentes voies de la dégradation de la quercétine- 3,4'-diglucoside induite par un traitement thermique à une température de 180°C pendant 5 minutes.

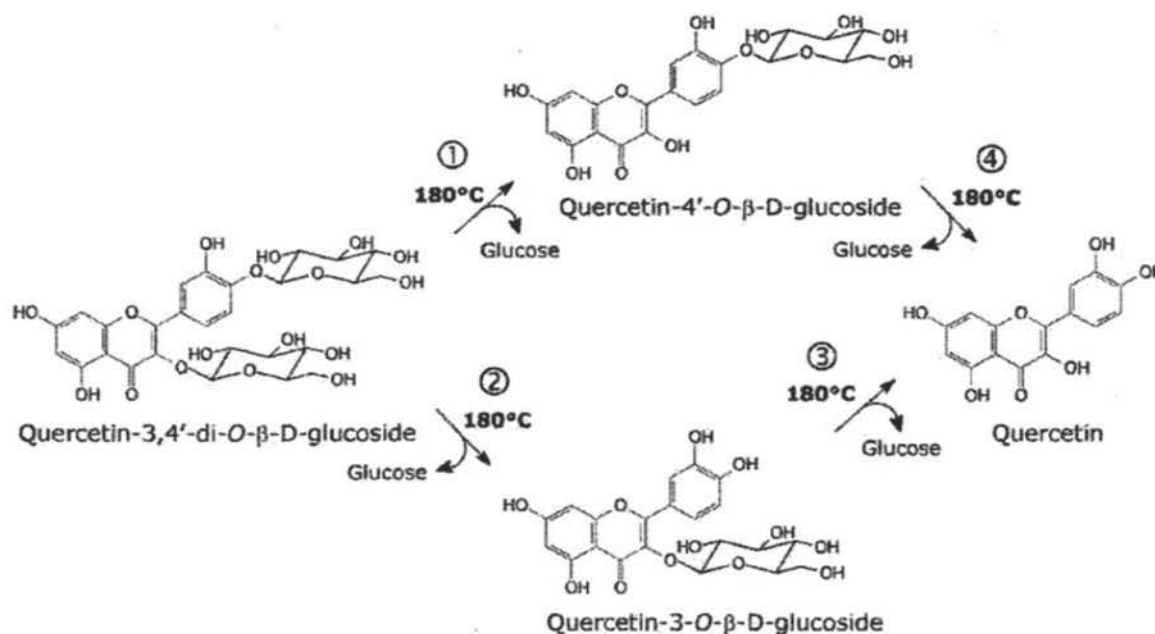


FIGURE 13: MECANISME DE LA DEGRADATION THERMIQUE DE LA QUERCETINE- 3,4'-DIGLUCOSIDE ET DE LA FORMATION RESPECTIVE DE LA QUERCETINE (ULBRICH ET AL., 2015)

Ulbrich et al. (2015), ont observé que la quercétine est le produit final principal de la dégradation de la quercétine- 3,4'-diglucoside. La première étape de la dégradation correspond à la déglycosylation de la quercétine-3,4' diglucoside en quercétine-3-glucoside et en quercétine-4'-glucoside. Par la suite, la quercétine-4'-glucoside est restée stable et est accumulée pendant le traitement thermique tandis que la quercétine-3-glucoside est dégradée par destruction de la liaison entre le sucre et le cycle C.

D'après les différents travaux de la littérature, on s'aperçoit que les produits de dégradation dépendent du type de traitement et des conditions de traitement. Cependant, on constate que l'acide protocatéchique est très souvent retrouvé comme produit de dégradation de la quercétine que ce soit après une oxydation ou après un traitement thermique.

La bibliographie nous a permis de souligner la sensibilité des flavonoïdes aux procédés de transformation notamment aux procédés thermiques. De plus, les flavonoïdes sont aussi sensibles à leur environnement : (i) la présence de lumière et d'oxygène favorisent la dégradation des flavonoïdes et (ii) de nombreuses interactions sont possibles entre les flavonoïdes et les ingrédients de la matrice alimentaire, pouvant diminuer ou augmenter la sensibilité des flavonoïdes. Ainsi, les flavonoïdes ne sont pas stables dans le temps, en présence d'oxygène, de lumière et à des températures élevées. Cependant, les données de la littérature ne permettent pas de prédire les effets de ces facteurs sur la dégradation des flavonoïdes car les études ont pour la plupart porté sur des procédés, des conditions opératoires, des flavonoïdes et des matrices alimentaires différentes. Pourtant, il paraît primordial, pour les flavonoïdes ayant une fort potentielle santé, de pouvoir prédire leur devenir en fonction des conditions opératoires et environnementales imposées par le procédé.

Dans la littérature, il a été montré un lien fort entre l'activité anti-oxydante des molécules et leur structure, ainsi la dégradation des flavonoïdes peut engendrer une perte d'activité biologique notamment d'activité anti-oxydante. Cependant, vu le peu d'études recensées, aucun lien n'a pu être établi entre la dégradation des flavonoïdes et la perte d'activité anti-oxydante. De même, très peu de produits de dégradation ont été identifiés induisant un manque de connaissance sur les nouvelles activités des solutions de flavonoïdes dégradées. Ainsi, notre objectif est de pouvoir établir dans un premier temps les relations entre la sensibilité des flavonoïdes, le procédé et les conditions opératoires appliquées et la structure des flavonoïdes. Dans un deuxième temps, nous chercherons à établir les relations entre le devenir de l'activité anti-oxydante des flavonoïdes, le procédé (les conditions opératoires appliquées) et la structure des flavonoïdes. Pour cela, des solutions aqueuses de flavonoïdes seront étudiées afin de ne pas avoir d'interférences avec la matrice alimentaire. Il est important d'utiliser plusieurs flavonoïdes de structure différente, pour cela nous avons choisi 6 flavonoïdes appartenant à des classes de flavonoïdes souvent retrouvées dans les matières premières alimentaires et complémentaires quant à leur structure. Il s'agit de la rutine (flavanol), la naringine (Flavanone), le mesquitol (Flavanol), l'ériodictyol (Flavanone), la lutéoline (Flavone) et la lutéoline-7-O-glucoside (Flavone).

La stratégie mise en œuvre pour établir la relation entre la sensibilité du flavonoïde, les conditions opératoires et leur structure est expliquée sur la figure 14. Il s'agit dans un premier temps d'étudier l'effet des procédés thermiques. Deux procédés seront testés, le premier dans des conditions isothermes, le second dans des conditions non isothermes. Les résultats sur les deux procédés seront comparés afin de pouvoir généraliser sur les deux modes de chauffage.

De plus, un deuxième solvant (10% propylène glycol/90% eau) afin de voir si la sensibilité des flavonoïdes est liée aux interactions flavonoïdes-solvant. Dans un deuxième temps, l'effet de l'environnement physico-chimique sera étudié par l'intermédiaire d'un procédé de stockage. Les effets du temps de stockage, de la présence de lumière et d'oxygène seront étudiés sur des solutions aqueuses de flavonoïdes.

Pour chaque procédé mis en jeu, la teneur résiduelle en flavonoïde sera déterminée par CLHP ; les cinétiques de dégradation seront tracées puis modélisées. De même l'activité anti-oxydante des solutions traitées sera mesurée par la méthode ABTS, l'évolution de l'activité antioxydante de la solution sera tracée en fonction du temps pour les différentes conditions opératoires. Nous chercherons en dernier lieu à identifier les structures des produits de dégradation des flavonoïdes étudiés. L'ensemble des informations nous permettra de discuter les relations entre la sensibilité des flavonoïdes, leur structure, leur activité anti-oxydante et les conditions opératoires du procédé subi.

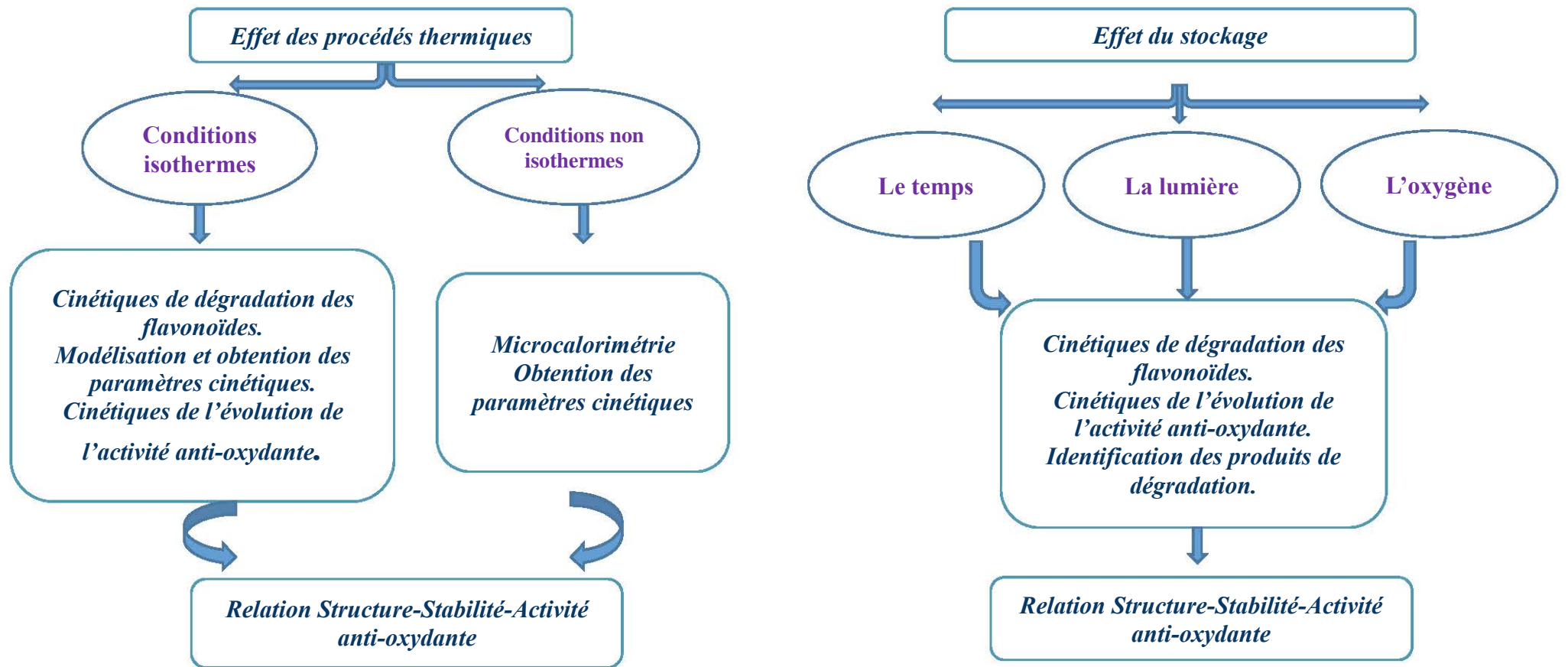


FIGURE 14: DEMARCHE EXPERIMENTALE POUR ETUDIER L'EFFET DES TRAITEMENTS THERMIQUES ET L'ENVIRONNEMENT PHYSICO-CHIMIQUE SUR LES FLAVONOÏDES

Matériels et Méthodes

I. Matériels

I.1. Produits chimiques utilisés

La naringine, la rutine, 2'-azinobis (acide 3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonique) sel de diammonium (ABTS) ont été achetés chez Sigma-Aldrich Chemical. L'ériodictyol, la lutéoline, la lutéoline 7-O glucoside ont été achetés chez Extrasynthèse. Le mesquitol a été extrait d'un arbre Kényan *proposis juliflora* (Sirmah et al.,2009). Le trolox et le persulfate de potassium ont été achetés chez Fulka. Le méthanol et l'éthanol sont respectivement issus de Carlo Erba et VWR. Le propylène glycol a été obtenu auprès d'Amresco. Tous les réactifs et solvants sont de qualité analytique.

I.2. Les flavonoïdes

Le choix des flavonoïdes s'est fait en se basant sur les critères suivants :

- Appartenir à une classe de flavonoïde souvent trouvée dans les matières premières alimentaires. Hormis les anthocyanes, quatre classes de flavonoïdes sont souvent trouvées dans les matières premières alimentaires : flavonols, flavones, flavanones et flavanols.
- Avoir une particularité structurale. Chaque flavonoïde différera des autres par une caractéristique structurale (présence d'un substituant glycosyle, présence d'une fonction énone, d'un groupement carbonyle en C4,...).
- Etre disponible à l'achat et d'un coût abordable.

Ainsi, les six molécules choisies sont la rutine (flavonol), la naringine (flavanone), l'ériodictyol (flavanone), le mesquitol (flavanol), la lutéoline (flavone) et la lutéoline 7-O glucoside (flavone). Leurs structures sont représentées sur la figure 15. Trois flavonoïdes glycosylés ont été choisis différant par la position du groupement glycosyle (qui est situé en position C3 pour la rutine et en position C7 pour la naringine et la lutéoline 7-O glucoside) et la nature du groupement glycosyle (rhamnose-glucose dans la rutine et la naringine, glucose dans la lutéoline 7-O glucoside). Les flavones (la lutéoline, la lutéoline 7-O glucoside) diffèrent des flavonols (la rutine) par l'absence de la structure catéchol. Les flavanones (la naringine, l'ériodictyol) diffèrent des flavonols (la rutine) par l'absence de la structure énone sur le cycle C. Les flavanols (le mesquitol) diffèrent des flavonols (la rutine) par l'absence de la structure énone et du groupe carbonyle sur le cycle C.

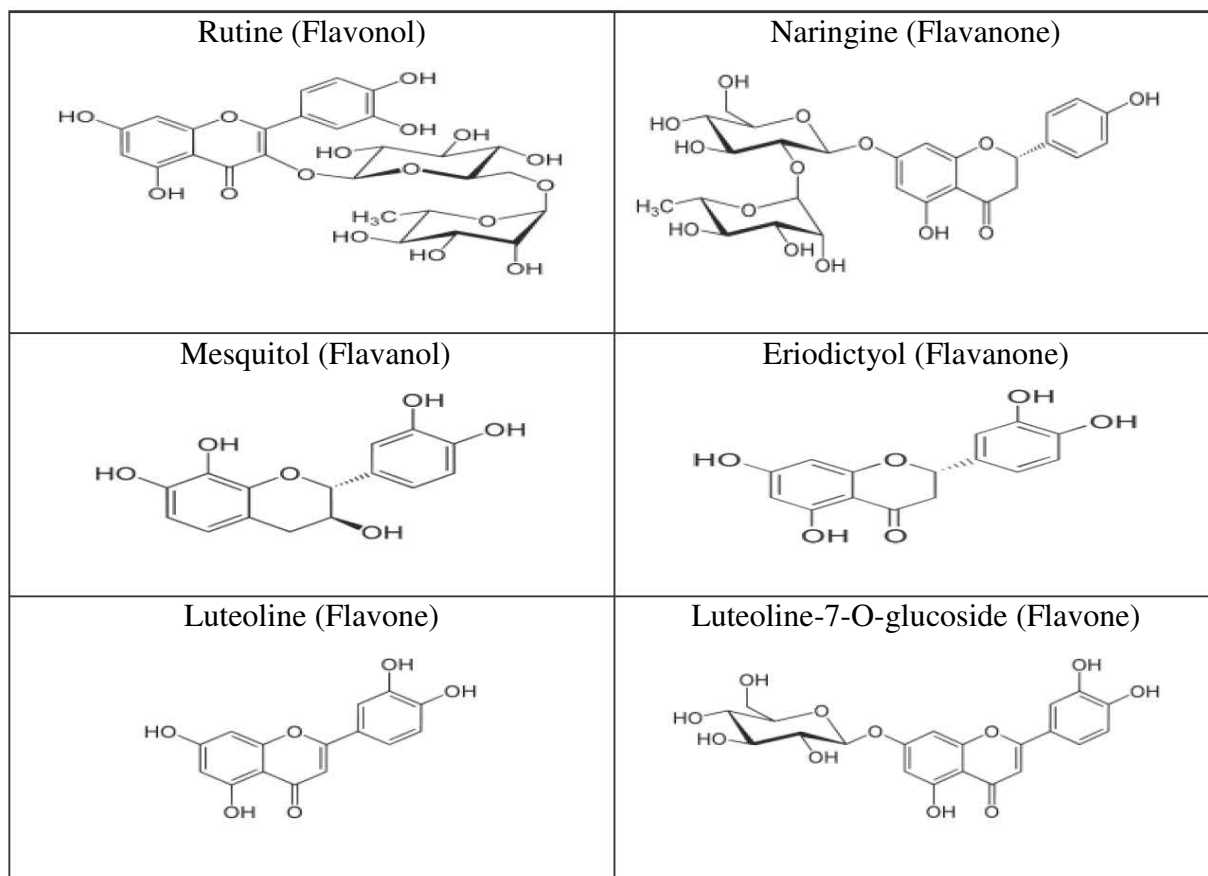


FIGURE 15: STRUCTURE DES FLAVONOÏDES

II. Méthodes

II.1. Préparation des solutions modèles

Les concentrations des solutions modèles de flavonoïdes sont limitées par la solubilité des molécules dans le solvant choisi. Le solvant d'étude est de l'eau afin de reproduire une matrice alimentaire végétale composée en majorité d'eau. Cependant, les flavonoïdes étant peu solubles dans l'eau, les concentrations de nos solutions sont faibles et posent problème pour l'utilisation de certaines techniques comme la CL-SM. Ainsi, d'autres solvants ont été utilisés afin d'augmenter la concentration des solutions étudiées (tableau 10).

Les solutions de flavonoïdes ont été obtenues par mélange du flavonoïde dans le solvant à l'obscurité, à une température de 25°C pendant 1h30 avec une vitesse d'agitation de 600 tr/min. La température et le temps de solubilisation ont été choisis afin de ne pas induire une dégradation des flavonoïdes durant la solubilisation. Des expériences préliminaires, ont permis de déterminer qu'à 25°C, les flavonoïdes ne se dégradent pas durant la solubilisation. La

concentration en flavonoïdes a été suivie par CLHP lors de la solubilisation. Au bout de 90 minutes, on atteint la concentration limite de solubilisation, qui reste stable sur 24 h.

TABEAU 10: CONCENTRATIONS DES DIFFERENTES SOLUTIONS DE FLAVONOÏDES ETUDIÉS

Solution	Concentration (mM)						
	Quercétine	Rutine	Eriodictyol	Mesquitol	Naringine	Lutéoline	Lutéoline-7-O-glucoside
Eau 100%	0,008	0,04	0,08	0,08	0,04	0,0087	0,014
propylène glycol 10%	0,03	0,04	0,08	0,08	0,04	Ne	Ne
KCL/KOH (0.1 mol/L KCL et 3.6×10^{-3} mol/L KOH)	1	0,5	0,5	Ne	Ne	Ne	Ne

Ne : non étudié

II.2. Etude de l'effet d'un procédé thermique dans des conditions isothermes

Un traitement thermique dans des conditions isothermes correspond à un chauffage à une température fixe pendant un temps donné.

II.2.1 Etude cinétique

Après solubilisation du flavonoïde, chaque solution est filtrée (0.20n µm) puis répartie dans 8 tubes en pyrex (10 mL). Les tubes sont alors chauffés dans un bain d'huile (Hubert, W8518D) pendant 120 min. Puis, les tubes sont prélevés toutes les 15 minutes, et refroidis pour atteindre une température de 30°C (figure 16).

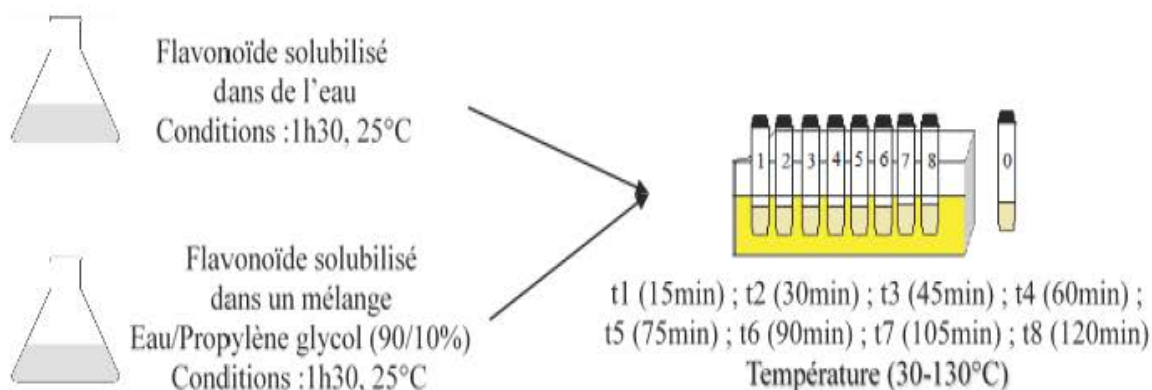


FIGURE 16: PROTOCOLE DE L'ETUDE DE L'EFFET D'UN PROCÉDE THERMIQUE DANS DES CONDITIONS ISOTHERMES

La gamme de température étudiée va de 30° jusqu'à 130°C. Les flavonoïdes solubilisés dans de l'eau et dans un mélange eau / propylène glycol ont été testés.

La teneur en flavonoïdes résiduelle a été mesurée par *CLHP* aussitôt le refroidissement effectué. Le pourcentage résiduel, défini comme la concentration en flavonoïde à l'instant t sur la concentration initiale de la solution mère, est tracé en fonction du temps de chauffage et ceci pour les différentes températures testées.

L'activité anti-oxydante de la solution a été mesurée dans les 24h suivant le refroidissement.

II.2.2. Modélisation des cinétiques

Pour estimer les paramètres cinétiques de la dégradation du flavonoïde par traitement thermique, on modélise les cinétiques obtenues précédemment. La dégradation des flavonoïdes par la chaleur suit une cinétique d'ordre 1 (Annexe1).

Ainsi, la vitesse de réaction (k) est déterminée d'après l'équation 13 :

$$\ln(C_t/C_0) = -kt \quad \text{Équation 13}$$

Où, C_0 est la concentration initiale du flavonoïde et C_t la concentration en flavonoïde après t minutes de traitement thermique et k la constante de vitesse de la réaction en (min^{-1}).

Lorsqu'on trace $\ln(C/C_0)$ en fonction du temps, on obtient une droite dont la pente donne l'opposé de la constante de vitesse de réaction k.

Par la suite, pour exprimer la dépendance de la dégradation en fonction de la température de chauffage, nous appliquons la loi d'Arrhénius pour obtenir l'énergie d'activation ainsi que la constante k_0 selon l'équation 14 :

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{Ea}{RT} \quad \text{Équation 14}$$

La constante de vitesse k permet aussi de calculer le temps de demi-vie qui est défini comme étant le temps nécessaire pour dégrader la moitié de la concentration en flavonoïde à une température bien déterminée. Le temps de demi-vie est calculé selon l'équation 15 :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Équation 15}$$

II.3. Etude de l'effet d'un procédé thermique dans des conditions non isothermes

Un traitement thermique dans des conditions non isothermes correspond à un chauffage selon un gradient de température. Pour reproduire un traitement thermique dans des conditions non isothermes, un microcalorimètre VP-DSC (VPDSC expanded range microcalorimeter, Microcal) a été utilisé.

II.3.1. Etude cinétique

Après solubilisation des flavonoïdes, les solutions ont été filtrées (0.20 µm) et dégazées pendant 8 minutes (Thermovacsample degassing and thermostat, Microcal Inc., vacuum), puis 1 mL a été placé dans la cellule du microcalorimètre. Les échantillons ont été chauffés de 30 à 125°C avec une vitesse de 4°C/h (figure 17). Les capacités de chaleur (ΔC_p) ont été obtenues pour chaque température (kcal/mol.°C). L'analyse des données a été réalisée par le logiciel Origin 7.0 (Microcal), et les enthalpies (ΔH) des réactions de dégradation ont été calculées après soustraction de la référence à l'échantillon.

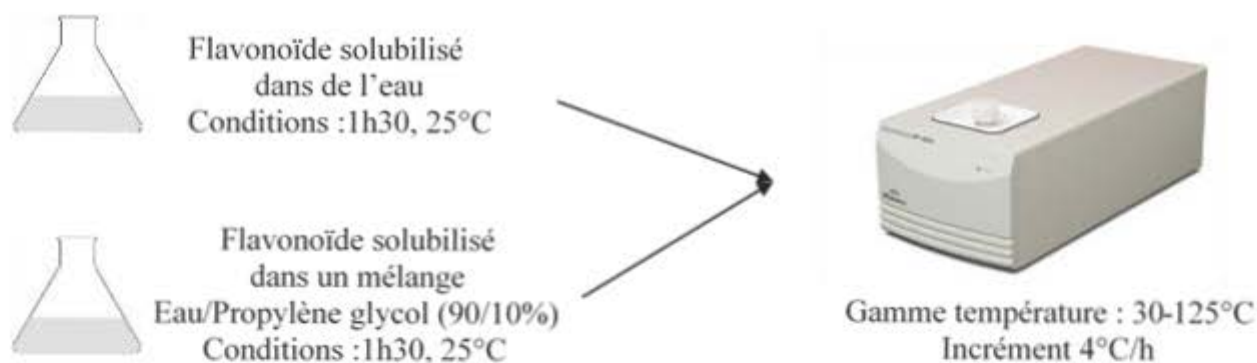


FIGURE 17: PROTOCOLE DE L'ETUDE DE L'EFFET D'UN PROCÉDE THERMIQUE DANS DES CONDITIONS NON ISOTHERMES

II.3.2 Modélisation des cinétiques

Les constantes de vitesse de dégradation ont été calculées pour une plage de températures où se produit la dégradation de la molécule (présence d'un pic exothermique). A ces températures, l'évolution de la vitesse de dégradation est exponentielle (**Ungar et al., 2003**).

Les constantes de vitesse k pour chaque température ont été déterminées selon l'équation 16 :

$$k_{T,av} = -\frac{\Delta A / \Delta t}{A_{av}} \quad \text{Équation 16}$$

Où ΔA est la variation de concentration en flavonoïdes à chaque intervalle de temps (équation 17), Δt est la durée totale de l'analyse de microcalorimétrie et A_{av} est la concentration moyenne de flavonoïde pendant chaque intervalle de temps (équation 18).

$$\Delta A = \left(\frac{\Delta H}{H_T} \right) \times \Delta A_T \quad \text{Équation 17}$$

Où ΔH est la variation d'enthalpie à l'intérieur de l'intervalle de temps (kcal/mol), H_T est l'enthalpie totale de la réaction de dégradation et ΔA_T est la quantité dégradée de flavonoïde mesurée par *CLHP*.

$$A_{av} = \left[1 - \frac{\left(\frac{H_2 + H_1}{2} \right)}{H_r} \right] \times \Delta A_T \quad \text{Équation 18}$$

Où H_1 et H_2 sont les enthalpies de décomposition partielle pour le début et la fin de chaque intervalle de temps.

Le modèle d'Arrhenius (équation 14) a ensuite été utilisé pour calculer les énergies d'activations, à partir des constantes de vitesse $k_{T,av}$

II.4. Etude de l'effet du stockage

Durant le stockage, seront étudiés l'effet de la durée du stockage, l'effet de la lumière et l'effet de la teneur en oxygène sur la dégradation des flavonoïdes et sur l'évolution de leur activité anti-oxydante. Pour cela, une enceinte climacell à température, humidité et luminosité contrôlées (Climacell, Fisher bioblock scientifique, MMM) a été utilisée. La température et l'humidité ont été respectivement fixées à 25°C et 50% d'humidité.

Après solubilisation, les solutions de flavonoïdes ont été filtrées (0.20 μm) puis réparties dans des tubes en pyrex. Quatre lots ont été préparés (figure 18). Deux seront dégazés (un barbotage d'azote de 2 minutes), une concentration en oxygène de 15 % est atteinte. Les deux autres seront laissés à l'air libre, une concentration en oxygène de 85% est atteinte. Un lot de chaque sera soumis à luminosité de 0% (obscurité) et de 100%. Un suivi a été réalisé chaque 24 heures pendant 9 jours excepté pour le mesquitol plus sensible où le suivi a été fait sur 24h. La teneur en flavonoïdes résiduelle et l'activité anti-oxydante de la solution ont été mesurées.

L'effet de la durée du stockage est établi en observant la cinétique d'évolution de la teneur en flavonoïdes à l'obscurité avec une faible teneur en oxygène. L'effet de la lumière sera obtenu en comparant le lot exposé à la lumière et celui laissé à l'obscurité. L'effet de l'oxygène sera obtenu en comparant les teneurs en flavonoïdes résiduels du lot dégazé et celui du lot non dégazé.

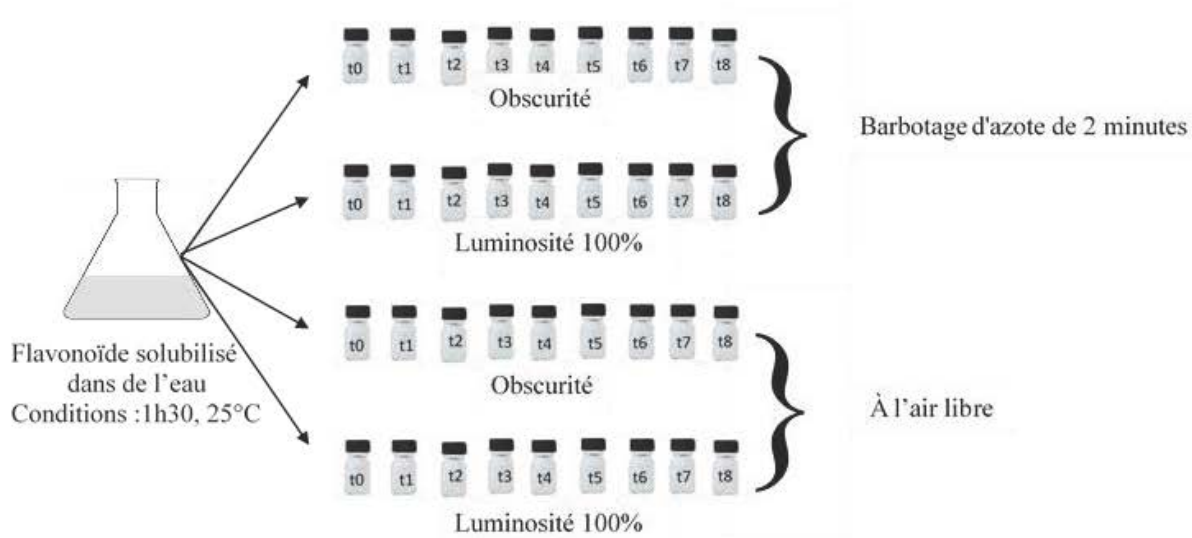


FIGURE 18: PROTOCOLE DE L'ETUDE DE L'EFFET DU STOCKAGE

II.5. Identification les produits de dégradation des flavonoïdes

Pour montrer la variabilité des voies de dégradation des flavonoïdes, on a choisi trois flavonoïdes avec des structures différentes. Les molécules choisies sont deux flavonols (la quercétine et la rutine) qui diffèrent entre eux par l'addition d'un substituant glycosyle en position 3. Le troisième flavonoïde est l'eriodictyol qui diffère de la structure de la quercétine par l'absence du motif énone et d'un hydroxyle en position 3. Les trois flavonoïdes ont été solubilisés dans un mélange KCl/KOH (tableau 10). Des conditions drastiques de traitement ont été utilisées pour assurer une dégradation totale du flavonoïde. Les solutions de flavonoïdes ont été chauffées à 130°C durant 2 h pour la dégradation par effet thermique. Pour l'effet de l'oxygène, les solutions ont été mises sous barbotage à l'oxygène durant 2h pour la quercétine et 26h pour la rutine et l'eriodictyol (figure 19).

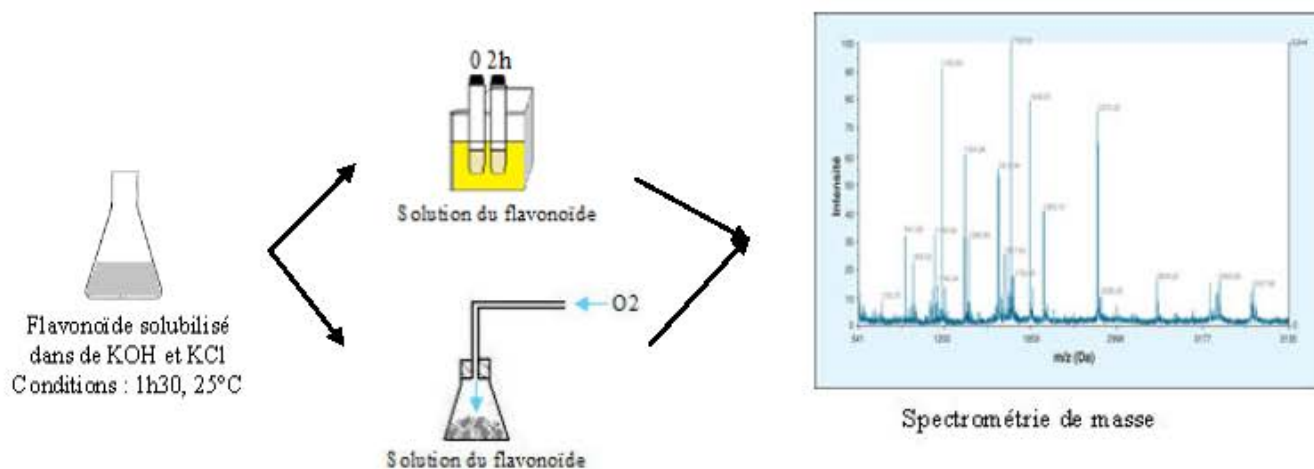


FIGURE 19: PROTOCOLE DE DETERMINER DES PRODUITS DE DEGRADATION DES FLAVONOÏDES

II.6. Méthodes analytiques

II.6.1. Mesure de la teneur en flavonoïdes résiduelle

Les flavonoïdes ont été quantifiés à l'aide d'un système de la chromatographie liquide CLHP La Chrom Elite (VWR HITACHI) qui consiste en une pompe quaternaire (L-2130), un échantillonneur automatique (L-2200) et un détecteur à barrette de diodes (L-2455). La colonne est une C18 (Grace) de dimensions 150x4.6 mm, maintenue à une température de 50°C. Les différents composés ont été séparés par un gradient composé d'eau (A) et de méthanol (B). Les échantillons ont été élués à un débit de 1 mL/min avec un gradient de: 95% d'eau (A) au temps 0 jusqu'à 100% de (B) à 10 min, et enfin de 95% (A) à 20 min jusqu'à la fin du programme. Le volume d'injection est de 50 µl. La détection a été effectuée simultanément à 200, 280, 254 et 350 nm. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en pourcentage par rapport à la teneur initiale. Trois mesures ont été réalisées pour tous les échantillons.

II.6.2. Mesure de l'activité anti-oxydante

La mesure de l'activité anti-oxydante a été réalisée par la méthode ABTS. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre SAFAS (Xenius) équipé d'une plaque à 96 puits.

L'activité anti-oxydante des flavonoïdes a été étudiée par l'évaluation de la capacité de nos échantillons à piéger les radicaux du sel 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique (ABTS^{•+}) selon la méthode décrite par **Re et al. (1999)**. Le pourcentage d'inhibition a été calculé par l'équation suivante (équation 19) :

$$(IP\%) = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} \times 100 \quad \text{Équation 19}$$

Où A_c et A_s sont l'absorbance du témoin et de l'échantillon d'essai, respectivement. Les résultats ont été exprimés en millimoles de valeurs TEAC (Trolox Antioxydant Equivalent Capacité). Trois mesures ont été faites pour tous les échantillons.

Pour interpréter la mesure de l'activité anti-oxydante, la capacité anti-oxydante des produits issus de la dégradation des flavonoïdes après le traitement thermique (Δ TEAC) a été déterminée (équation 20).

$$\Delta\text{TEAC} = \text{TEAC}_{\text{traitée}} - \text{TEAC}_{\text{prédit}} \quad \text{Équation 20}$$

Avec $\text{TEAC}_{\text{traitée}}$ est le TEAC mesuré de la solution après traitement, contenant le flavonoïde résiduel et les produits de dégradation et le $\text{TEAC}_{\text{prédit}}$ est le TEAC calculé d'après la concentration résiduelle du flavonoïde étudié. En effet, à la fin du traitement, les flavonoïdes n'ont pas été entièrement disparus. Ainsi, afin de déterminer l'activité anti-oxydante des produits de dégradation des flavonoïdes, il est essentiel de soustraire l'activité anti-oxydante des flavonoïdes restant en solution.

II.6.3. Détermination les produits de dégradation des flavonoïdes

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) a été utilisée pour identifier les masses molaires des produits provenant de la dégradation des flavonoïdes. Dans LC-MS, l'échantillon est chargé et subit une vaporisation. Les composants de l'échantillon sont ionisés, ce qui entraîne la formation de particules chargées (ions). Les molécules chargées (ions) sont séparés en phase gazeuse en fonction de leur rapport masse-charge (m/z). On peut donc, de cette manière, trier en phase gazeuse les ions dont la masse diffère et déterminer leur masse (Arpino,1992).

Les analyses des flavonoïdes et les composés de dégradation ont été réalisés sur un système CLHP-SM (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA). Le système consiste en une pompe de distribution de solvant binaire reliée à un détecteur à réseau de photodiodes (PDA) et d'un spectromètre de masse LTQ équipé d'une interface d'ionisation sous pression atmosphérique fonctionnant en mode électrospray négatif (ESI). 25 μ L d'une solution de flavonoïdes ont été injectés sur une colonne C18 Alltima (Grace / Alltech, Darmstadt, Allemagne) 150mm * 2.1mm. Le débit a été fixé à 200 μ l. min⁻¹. Les phases mobiles utilisées sont de l'eau modifiée avec de l'acide trifluoroacétique (0,1%) pour A et de l'acétonitrile modifié avec de l'acide

trifluoroacétique (0,1%) pour B. Les produits de dégradation ont été élués en utilisant une première étape isocratique à 15% de B pendant 3 min, puis un gradient linéaire de 15% à 90% de B pendant 27 min.

De plus, il a été nécessaire pour identifier les produits de dégradation des flavonoïdes d'augmenter la concentration en produits de dégradation et donc la concentration en flavonoïde mère. Pour cela, nous avons utilisé un mélange de KOH/KCl.

II.6.4. Analyse des données

Toutes les expériences ont été effectuées trois fois. Les moyennes sont calculées ainsi que les écarts-types, qui sont indiqués dans la légende mais non représentés pour ne pas surcharger les graphiques. Le module Origine 7.0 du logiciel Microcal et scidavis ont été utilisés pour analyser les données de microcalorimètre. Le logiciel SigmaPlot a été utilisé pour modéliser les cinétiques de dégradation. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel R (3.0.2). Des différences significatives sont décelées pour $p < 0,5$.

Résultats

Chapitre I

Effet des procédés thermiques

Dans la littérature, il a été démontré que les procédés thermiques entraînent une dégradation des flavonoïdes lorsque ceux-ci sont exposés à certaines températures. Cependant aucune relation n'a pu être établie entre l'intensité des dégradations et les conditions opératoires appliquées car les résultats varient selon le type de procédés thermiques et de matrices alimentaires. Afin d'obtenir des résultats plus précis, nous nous proposons d'étudier l'effet de deux procédés thermiques sur le devenir de six flavonoïdes en s'affranchissant de l'effet matrice. Les résultats sont présentés sous forme d'articles.

1.1. Effet des procédés thermiques dans des conditions isothermes

1.1.1. Introduction

Dans cet article, nous cherchons à déterminer la sensibilité de six flavonoïdes de structure différente (la rutine, la naringine, l'ériodictyol, le mesquitol, la luteoline et la lutéoline 7-O glucoside) à un procédé thermique appliqué dans des conditions isothermes. Il s'agit de chauffer une solution aqueuse de flavonoïdes à une température donnée pendant 2 heures. La gamme de température étudiée va de 30°C à 130°C. Des prélèvements sont effectués toutes les 15 minutes permettant de mesurer la teneur résiduelle en flavonoïde et l'activité anti-oxydante de la solution traitée. Les cinétiques de dégradation des flavonoïdes au cours du temps ont été tracées pour différentes températures, puis, modélisées afin d'obtenir les paramètres cinétiques de la dégradation. En dernier lieu, une identification des produits de dégradation de la rutine, de l'ériodictyol et de la quercétine a été réalisée.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication qui s'intitule « Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids ». Cet article a été publié dans la revue Journal of Food Processing and Preservation.

Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids

Hind Chaaban¹ | Irina Ioannou¹  | Latifa Chebil¹ | Manel Slimane¹ |
Christine Gérardin² | Cédric Paris³ | Céline Charbonnel¹ | Leila Chekir⁴ |
Mohamed Ghoul¹

¹Laboratory of Reactions and Process Engineering (LRGP), Lorraine University, 2 avenue de la Forêt de Haye—TSA, Vandœuvre Cedex 40602 54518, France

²Laboratory of Studies and Research on Wood Material (LERMAB), Lorraine University, Boulevard des Aiguillettes—BP, Vandœuvre lès Nancy Cedex 70239 54506, France

³Laboratory of Biomolecule Engineering (LIBio), Lorraine University, 2 avenue de la Forêt de Haye—TSA, Vandœuvre Cedex 40602 54518, France

⁴Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Dental Medicine, University of Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisia

Correspondence

Irina Ioannou, Laboratory of Reactions and Process Engineering (LRGP), Lorraine University, 2 avenue de la Forêt de Haye—TSA, Vandœuvre Cedex 40602 54518, France.

Email: irina.ioannou@univ-lorraine.fr

Abstract

The objective of this paper is on the one hand to study the effect of heat processing (30 to 130°C for 2 h) on the stability and antioxidant activity of six flavonoids (rutin, naringin, eriodictyol, mesquitol, luteolin, and luteolin 7-O glucoside), and on the other hand to establish the relation structure–activity–stability of these compounds. The dependency on temperature of the six kinetics was well described by the Arrhenius law and the main parameters provided by this model are determined and compared in this paper. Activation energies found were 107.3 kJ/mol for rutin, 100.6 for naringin, 33.3 for mesquitol, 68.2 for eriodictyol, 51.4 for luteolin, and 120 for luteolin 7-O-glucoside. The data collected showed that glycosylated flavonoids are more resistant than aglycon flavonoids to heat treatment. Moreover, it was also observed that despite the total degradation of some flavonoids, the treated solutions still have an antioxidant activity.

Practical application

Flavonoids are mainly consumed in processed foods. Thus, flavonoids often undergo heat processing. Knowing the thermal stability and the evolution of their antioxidant activity are particularly relevant in the field of food processing. The results of this study allow information to be collected on the relationship between heat stability–flavonoid structure and antioxidant activity. This information will be useful for the formulation of new food products or for the design of new food processes.

KEYWORDS

antioxidant activity, flavonoid, heat processing, modelling, thermal stability

1 | INTRODUCTION

Over the last few decades, epidemiological studies have shown that consuming fruit and vegetables rich in phenolic compounds leads to a general well-being of consumers (Tomás-Barberán, Ferreres, & Gil, 2000). These benefits have been attributed to phenolic compound properties, particularly antioxidant activity which plays a role in this health-promoting capacity (Mellor & Naumovski, 2016). Among phenolic compounds, flavonoids are the most studied class and much interest is focused on them. The antioxidant activity of flavonoids depends on their structure (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996). Modifications of the structure such as alkylation or glycosylation induce a change of their properties; antioxidant activity

can be increased or decreased depending on these modifications. Moreover, the human diet is based mainly on the consumption of products having undergone heat treatment, as a transformation step from raw materials to finished products. These processes may have an impact on flavonoid structure and consequently on their antioxidant activities (Bordiga, Travaglia, Mazza, & Arlorio, 2015; Nayak, Liu, & Tang, 2015; Saikia, Mahnot, & Mahanta, 2016).

Flavonoids are classified into nine groups. Compounds belonging to the same group differ from each other in their structure (degree and position of hydroxylation, presence of a substituent, etc.). These differences in structure can affect their stability to heat processing. Most available data concern only two groups—anthocyanins and isoflavones. Studies on anthocyanins have focused on the modeling of flavonoid

degradation (Patras, Brunton, O'Donnell, & Tiwari, 2010) while studies on isoflavones have investigated the thermal stability of several isoflavones according to their structure (Stintzing, Hoffmann, & Carle, 2006; Ungar, Osundahunsi, & Shimoni, 2003). Apart from these two main studies, Buchner, Krumbein, Rhon, and Kroh (2006) carried out preliminary investigations on quercetin and rutin, and suggested the presence of correlations between structure, antioxidant activity, and heat treatment. Few studies have dealt with the identification of new formed products from flavonoid degradation. This is because they are unstable and lead to further degradations (Dall'acqua, Miolo, Innocenti, & Cafieri, 2012; Ramešová, Sokolová, Terábek, & Degano, 2013). Only Buchner et al. (2006) proposed a degradation pathway for quercetin during a thermal process at 100°C under oxygen conditions. Thus, a lot still has to be discovered about the impact of heat treatment on the relationship between structure and antioxidant activity of flavonoids and about the identification of the degradation products. Such findings are essential for the development of a tool to predict the effect of heating on flavonoid structure, antioxidant activity, and biological activities. In this paper, the thermal stability of rutin, mesquitol, naringin, eriodictyol, luteolin, and luteolin 7-O glucoside was investigated. These compounds were heated to different temperatures for 2 hr. The kinetics of their degradations were modeled and the relationship between the various phytochemical structures and their antioxidant activities were studied.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Chemicals

Naringin (purity > 95%), rutin (purity > 95%), 2'-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical. Eriodictyol, luteolin, luteolin-7-O-glucoside were purchased from Extrasynthese (purity > 98%). Mesquitol (purity > 90%) was extracted from a Kenya tree *Propolis juliflora* (Sirmah, Dumarcay, Masson, & Gerardin, 2009). Trolox and potassium persulfate were purchased from Fluka. Methanol and ethanol were from Carlo Erba and VWR, respectively. All reagents and solvents were of analytical grade.

2.2 | Structural differences between flavonoids

The flavonoids chosen for this study are characterized by a difference in their structure and have a good solubility in water. The flavonoids are subdivided into nine classes. All compounds of the same class have a common structure. Four classes are relevant to study because their common structures differ from each other by one structural element. To study the effect of heat treatment, six molecules belonging to these four classes of flavonoid were selected: flavones (luteolin, luteolin 7-O glucoside) differ from flavonols (rutin) by the absence of the catechol structure. Flavanones (naringin, eriodictyol) differ from flavonols (rutin) by the absence of the enone structure on the C-ring. Flavanols (mesquitol) differ from flavonols (rutin) by the absence of the enone structure and a group carbonyl on the C-ring. In Figure 1, we can see the

structure of the six flavonoids. In this study, water was chosen as a food matrix.

2.3 | Model solutions

Aqueous solutions of six flavonoids were prepared according to their solubility limit (naringin 0.29 mM, rutin 0.041 mM, mesquitol 0.93 mM, eriodictyol 0.059 mM, luteolin 0.0087 mM, and luteolin-7-O-glucoside 0.014 mM). Flavonoids were solubilized in the dark at 25°C until maximum solubilization was achieved. The pH value of the different solutions is equal to 6.6 ± 0.1 .

2.4 | Thermal treatment of model solutions

Thermal treatments were conducted in an oil-based bath (Hubert, W8518D). The different model solutions were filtered through a syringe filter (0.20 μ m) then 10 mL samples of each solution were put into screw-cap pyrex tubes and heated from 70 to 130°C for a total duration of 120 min. Samples were taken every 15 min and cooled in an ice bath to 30°C. Preliminary studies showed that differences in the degradation of flavonoids after 2 hr of heating are not significant. The residual flavonoid content and the antioxidant activity of the solution were measured.

2.5 | HPLC/DAD analysis

Flavonoid contents were analyzed in an Elite Lachrom HPLC system (VWR HITACHI) which consisted of a quaternary pump (L-2130), an autosampler (L-2200), and a diode-array detector (L-2455). The analyses were carried out on a C18 (150 \times 4.6 mm) column (Grace). The different compounds were separated using a water (A) + methanol (B) elution system. Samples were eluted at a flow rate of 1 mL/min with a gradient of 95% water (A) at time 0 up to 100% (B) at 10 min and finally 95% (A) at 20 min before the end of the program. The total duration was 30 min. The injection volume was of 50 μ L and the column temperature was set at 50°C. The detection was performed simultaneously at 200, 280, 254, and 350 nm. Flavonoid content was expressed as a percentage compared to the initial content. Then the degradation kinetic was plotted according to heating time. Triplicate measurements were taken for all samples.

2.6 | Identification of the new formed products from flavonoid degradation

A solution of quercetin at 1 mM was prepared in 100 mM KCl and 0.36 mM KOH in order to increase solubility. Aqueous solutions of rutin and eriodictyol were prepared at 0.65 and 0.059 mM, respectively. These three solutions were filtered through a syringe filter (0.20 μ m) and heated to 130°C for 2 hr. Qualitative and semiquantitative analyses of new formed products were realized using an HPLC-MS system (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting of a binary solvent delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and an LTQ mass spectrometer equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in electrospray negative mode (ESI⁻). 25

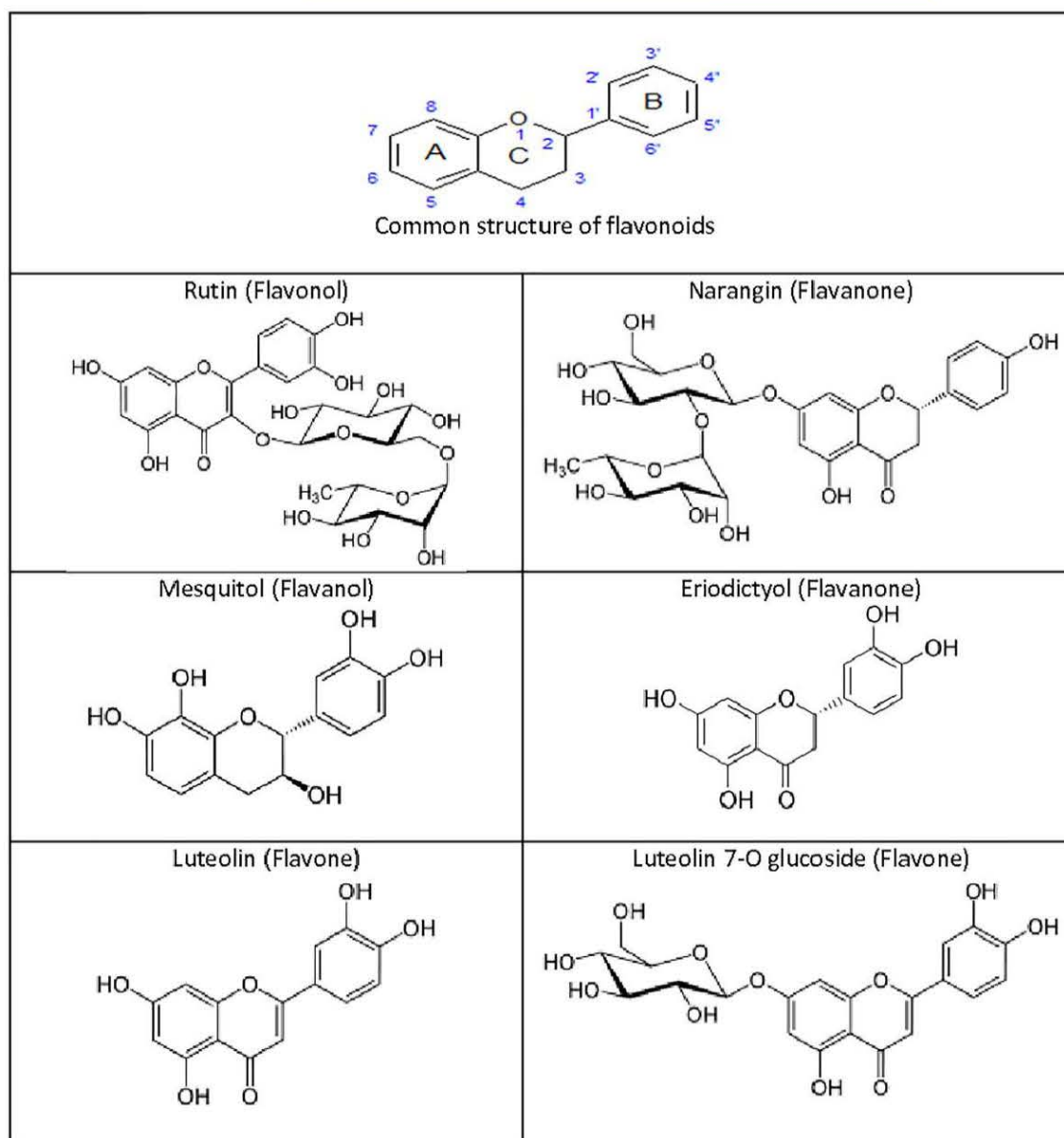


FIGURE 1 Chemical structures of the flavonoid studied

μL of flavonoid degraded solutions was separated on a C18 Alltima ($150\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$) column (Grace/Alltech). The flow rate was set at $200\ \mu\text{L min}^{-1}$. The mobile phases for quercetin and rutin were water modified with trifluoroacetic acid (0.1%) for A and acetonitrile modified with trifluoroacetic acid (0.1%) for B. The mobile phase for eriodictyol was water for A and methanol for B.

Degradation products were eluted using a first isocratic step at 15% of B for 3 min and then a linear gradient from 15% to 70% of B for 21 min. Mass spectrometric conditions were as follows for ESI⁻ mode: spray voltage was set at 5 kV; source gases were set (in arbitrary units min^{-1}) for sheath gas, auxiliary gas, and sweep gas at 40, 10, and 10, respectively; capillary temperature was set at 300°C ; capillary voltage at -36 V ; tube lens, split lens, and front lens voltages at -80 , 44, and 3.25 V , respectively. Ion optic parameters were optimized by automatic tuning using a standard solution of

rutin at 0.1 g L^{-1} infused in the mobile phase (A/B: 50/50) at a flow rate of $5\ \mu\text{L min}^{-1}$. Full scan MS spectra (100 to $2,000\ m/z$) and data dependent MS² scans for structural investigation were performed using an LTQ (Linear Trap Quadrupole). Raw data were processed using the XCALIBUR software program (version 2.1, <http://www.thermoscientific.com>). MS² fragmentation data were compared when possible to available literature in order to identify the nature of degradation products.

2.7 | Antioxidant assay (ABTS)

Antioxidant activity was determined every 15 min during the thermal treatment by the trolox equivalent antioxidant capacity method. ABTS assays were performed using a spectrofluorimeter SAFAS (Xenius) equipped with a 96-well polystyrene plate.

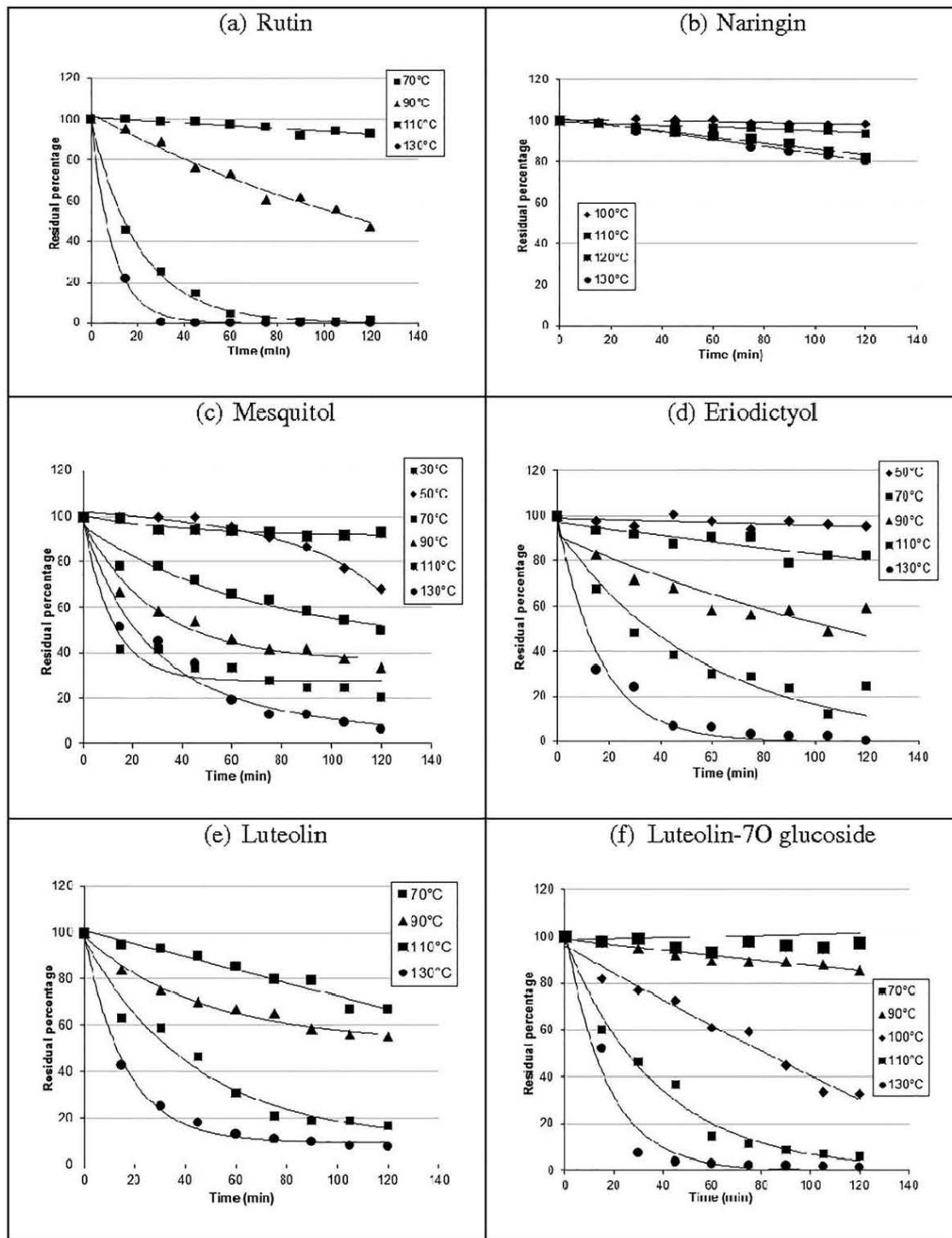


FIGURE 2 Degradation kinetics of flavonoids at different temperatures over 2 hr standard deviations are equal to 2%

Scavenging free radical potentials were tested in an aqueous solution of $ABTS^{\bullet+}$ according to the method described by Re, Pellegrini, Proteggente, Yang, and Rice-Evans (1999) with modifications for use in microplates. The percentage of inhibition was calculated by the equation: $(IP\%) = 100 \times (A_C - A_S) / A_C$, where A_C and A_S are the absorbance of the control and test sample, respectively.

Results were expressed as millimoles of TEAC values (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). From this measurement, we deter-

mined $\Delta TEAC$. It corresponds to the difference between the total TEAC of the solution and the TEAC due to the residual flavonoid in solution. Triplicate measurements were taken for all samples.

2.8 | Modeling of the degradation kinetics

To estimate the kinetic parameters of the flavonoid degradation during heat treatment, the order of the reaction was determined. The residual

TABLE 1 Kinetic parameters of rutin, naringin, eriodictyol, luteolin, luteolin-7-o-glucoside, and mesquitol during thermal degradation

T (°C)	Flavanone		Eriodictyol		Flavone		Flavonol			
	Rutin k (min ⁻¹)	t _{1/2} (h)	Naringin k (min ⁻¹)	t _{1/2} (h)	Luteolin k (min ⁻¹)	t _{1/2} (h)	Luteolin glucoside k (min ⁻¹)	t _{1/2} (h)	Mesquitol k (min ⁻¹)	t _{1/2} (h)
30	ni		ni		ni		ni		0.0009 ± 0.0001	12.83
50	nd		ni	0.0003 ± 0.0001	38.51	nd	nd		0.0020 ± 0.0001	5.78
70	0.0006 ± 0.0001	19.25	ni	0.0017 ± 0.0001	6.8	0.0033 ± 0.0001	3.5	nd	0.0061 ± 0.0002	1.89
90	0.0058 ± 0.0002	1.99	nd	0.0073 ± 0.0002	1.58	0.0050 ± 0.0001	2.31	0.0013 ± 0.0001	0.0104 ± 0.0002	1.11
100	0.0170 ± 0.0004	0.68	nd	ni		0.0071 ± 0.0001	1.63	0.0086 ± 0.0002	ni	
110	0.0509 ± 0.0012	0.23	0.0004 ± 0.0001	28.88	0.0187 ± 0.0004	0.62	0.0179 ± 0.0004	0.65	0.0140 ± 0.0003	0.83
120	0.0722 ± 0.0017	0.16	0.0016 ± 0.0001	7.22	ni					
130	0.1590 ± 0.0036	0.07	0.0019 ± 0.0001	6.08	0.0469 ± 0.0011	0.25	0.0444 ± 0.0133	0.25	0.0744 ± 0.0223	0.16
OH groups	4 (5.7.3'4')		2 (5.4')	4 (5.7.3'4')		4 (5.7.3'4')		3 (5.3'4')	5 (3.7.8.3'4')	
Enone motif	Enone motif		Enone motif missing	Enone motif missing		Enone motif		Enone motif	Enone motif missing	
Carbonyl group	Carbonyl group		Carbonyl group	Carbonyl group		Carbonyl group		Carbonyl group	No carbonyl group	
Substituting	Rhamnose-glucose position 3		Rhamnose-glucose position 7	Without substitution		Without substitution		Glucose position 7	Without substitution	
Ea (kJ/mol)	107.3		100.6	68.2		51.4		120.0	33.3	

Note. For a flavonoid given, all constant rates are significantly different.
ni = not investigated; nd = not degraded.

TABLE 2 Antioxidant activity and information on the structure of the different flavonoids

	Rutin	Naringin	Eriodictyol	Luteolin	Luteolin glucoside	Mesquitol
Hydroxyl groups (position. number)	4 (5.7.3'.4')	2 (5.4')	4 (5.7.3'.4')	4 (5.7.3'.4')	3 (5.3'.4')	5 (3.7.8.3'.4')
Enone motif	Y	N	N	Y	Y	N
Carbonyl group	1	1	1	1	1	0
Substituting	Rhamnose-glucose position 3	Rhamnose-glucose position 7	No substituting	No substituting	Glucose position 7	No substituting
Antioxidant activity (mmol/l)	3.15 ^a ± 0.35	0.17 ^b ± 0.03	1.22 ^c ± 0.06	5.56 ^d ± 1.45	4.21 ^d ± 0.56	0.92 ^e ± 0.01

Note. Groups found by Tukey analysis are indicated by letters on the antioxidant activity.

concentration was plotted over time according to (1). The constant rate k corresponds to the slope of the straight line obtained.

$$\ln(C_t/C_0) = -kt, \quad (1)$$

where C_0 is the initial flavonoid content (mg/l) and C_t is the flavonoid content (mg/l) after t minutes of heating at a given temperature, k is the reaction rate constant (min^{-1}). Half life time $t_{1/2}$ can be determined by (2). It corresponds to the heating time required to degrade 50% of the flavonoid content (min).

$$t_{1/2} = \ln 2/k. \quad (2)$$

The increase and decrease of temperature during heating were very rapid so we can ignore them and consider that we are in isothermal conditions. Thus, the temperature dependence of the degradation rate constants can be modeled using the Arrhenius law both for temperatures below and above 100°C. Activation energies E_a (kJ/mol) were calculated by the following equation:

$$\ln k = \ln k_0 - (E_a/RT), \quad (3)$$

with R is the ideal gas constant ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) and T is the heating temperature (K).

2.9 | Statistical analysis

Each experiment was performed using three replicates. The standard deviations were respectively equal to 2% and 2 mmol trolox/L for residual concentration and ΔTEAC . So, the kinetics of the flavonoid degradation and the antioxidant activity determination are repeatable. Moreover, an ANOVA followed by a Tukey test (freeware R[®] (2.11.1)) was performed to evaluate significant differences on kinetic parameters (k).

3 | RESULTS

3.1 | Degradation kinetics of the flavonoids

The degradation kinetics of rutin, naringin, mesquitol, eriodictyol, luteolin, luteolin-7-O-glucoside in the aqueous system at different temperatures over 2 hr were investigated. The results obtained are summarized

in Figure 2. The degradation of rutin (Figure 2a) according to the heating temperature and time showed that, at 70°C, less than 10% of rutin was depleted after 2 hr of heating while only 50% of the flavonoid content was lost at a temperature of 90°C. For temperatures above 100°C, a sharp degradation was observed. Thus, after 45 min at 130°C, rutin was no longer detectable by the HPLC/DAD system. As indicated in Figure 2b, naringin shows a higher stability than rutin when heated to 100, 110, 120, and 130°C. No degradation was observed for temperatures lower than 100°C and less than 2% at 100°C. At a temperature of 130°C, only 20% of naringin content was depleted. Mesquitol was highly sensitive even at low temperatures (Figure 2c). In fact, at 30°C about 10% of reduction was already observed and more than 50% at 70°C. At a higher temperature (130°C) less than 7% of mesquitol content remained in the solution. The degradation kinetic of eriodictyol is presented in Figure 2d. Little degradation—less than 5%—was observed for temperatures below 70°C. For higher temperatures 90 and 110°C, 40% and 25% of reduction were observed respectively, whereas, at 130°C, the residual concentration of eriodictyol was not detectable. Figure 2e shows the luteolin degradation kinetics. It appears that the luteolin content decreased by 30% at a temperature of 70°C. At a temperature of 90°C, the loss of luteolin was more than 45%. Heating to a temperature of 110°C led to a decrease in the luteolin content by more than 80% and more than 90% at 130°C. Luteolin-7-O-glucoside showed a higher stability than luteolin (Figure 2f) when the heat treatment applied was less than 100°C. In fact at 70 and 90°C, the decline in the concentration of luteolin 7-O-glucoside was 10% at 70°C and 15% at 90°C compared with 30% and 45% for luteolin, respectively. At higher temperatures, luteolin-7-O-glucoside became more sensitive than luteolin.

All the flavonoids studied were found to be heat sensitive. Flavonoid degradation increases with heating magnitude and duration. The best curve fit was obtained using an exponential decay. Differences were found between the six flavonoids concerning their thermal stability. These results are in agreement with previous studies which reported a different thermal stability according to the flavonoid structure (Buchner et al., 2006; Stintzing et al., 2006; Ungar et al., 2003). Studies dealing with the modeling of degradation kinetics show either exponential or sigmoidal degradation depending on the kind of flavonoid, the pH, or the temperature (Stintzing et al., 2006; Ungar et al., 2003).

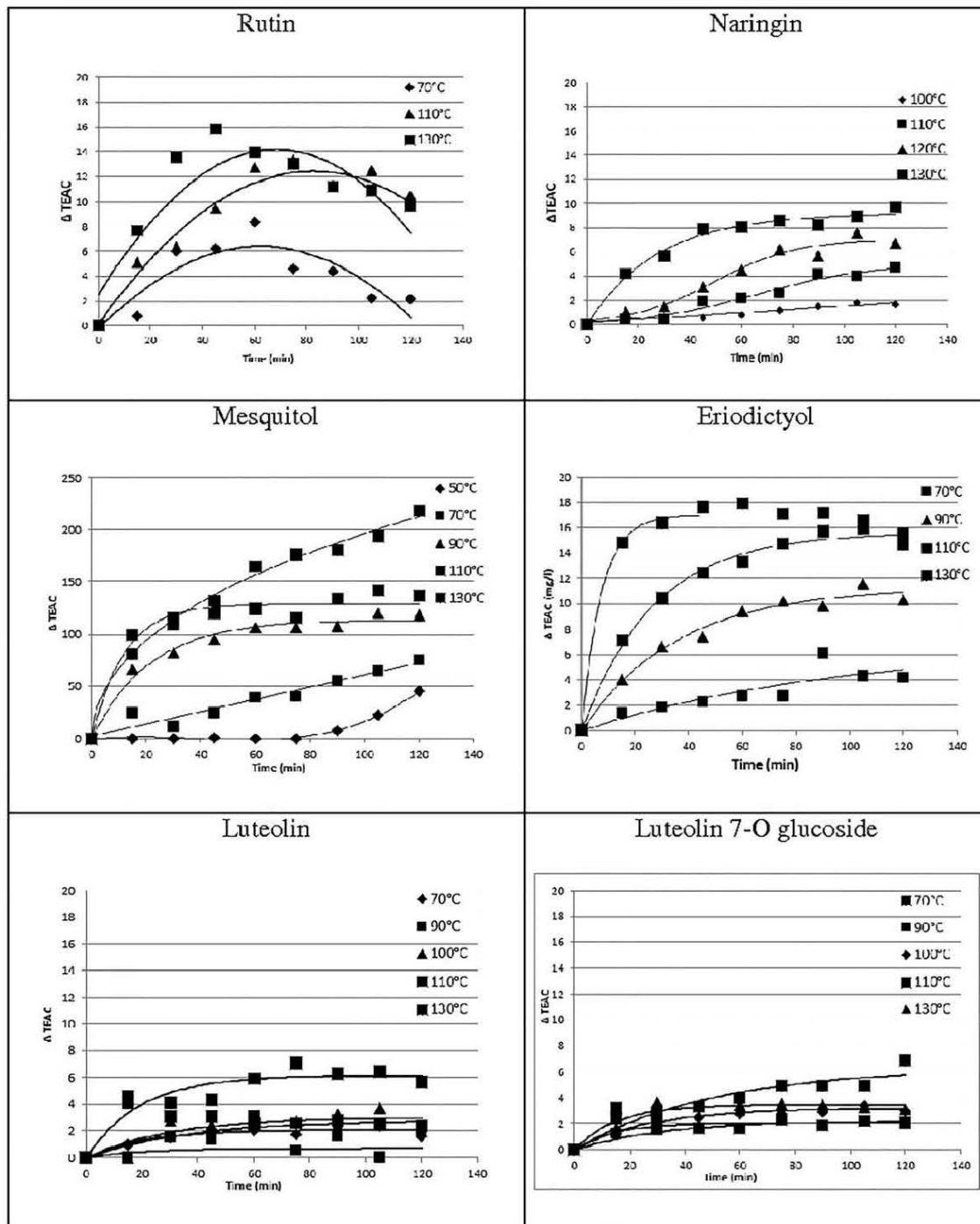


FIGURE 3 Evolution of Δ TEAC (mmol trolox/l) during the thermal treatment standard deviations are equal to 2 mmol trolox/l

3.2 | Kinetic parameters determination

To estimate the kinetic parameters of flavonoid degradation during heat treatment, the order of the reaction was determined. Logarithm (C/C_0) was plotted versus heating time. Straight lines were obtained with good determination coefficients (Annex materials). Thus, degradations follow a first-order kinetic. Most studies on the flavonoid degradation have reported that this degradation follows first-order kinetic (Patras et al., 2010). Constant rates and half-life times are given in Table 1. The Arrhenius model was used to calculate temperature dependence. The

Arrhenius model is found to be a reliable mathematical method according to the determination coefficient values (Annex materials).

The rate of degradation (k) varies for a given compound according to temperature, and for a given temperature it varies depending on the nature of the compound studied. However, the magnitude of these variations according to temperature is not the same for all studied compounds. As an illustration of this phenomenon, the k values obtained at 130°C were compared. It appears that naringin and mesquitol are the flavonoids that are characterized by the slowest kinetics of degradation

TABLE 3 LC-MS data obtained for the thermal degradation of quercetin, rutin, and eriodictyol

Peak	Retention time (min)	<i>m/z</i> values [M–H] [–]	<i>m/z</i> values MS/MS	Suggested compound
Quercetin (1 mM) in 100 mM KCl and 0.36 mM KOH				
P1	9.93	317	191–299–207–163	2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one
P2	11.82	349	330	(3',4',5',6'-tetrahydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one
P3	12.40	333	ND	(3',4',5'-trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one
P4	3.28	181	ND	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-oxoacetic acid
P5	4.67	544	ND	Unidentified
P6	5.46	169	151	2,4,6-trihydroxybenzoic acid
P7	24.03	297	183	Unidentified
Rutin (0.65 mM) in water				
P1	4.53	278	197	Unidentified
P2	6.52	153	ND	Protocatechuic acid
P3	8.83	1,217	909–601	Dimer
P4	12.12	463	301	Quercetin-glucose
P5	13.41	607	317	Unidentified
P6	17.42	301	179–151	Quercetin
Eriodictyol (0.059 mM) in water				
P1	8.46	197	133	3-(3,4-dihydroxyphenyl)–3-hydroxypropanoic acid
P2	11.87	165	137–121	3-(3,4-dihydroxyphenyl) propanal
P3	13.53	301	286–242–283–257	Unidentified

ND = no data obtained.

with a *k* of 0.0019 and 0.0236 min^{–1}, respectively, followed by eriodictyol and luteolin with, respectively, 0.0469 and 0.0444 min^{–1}. Then, the most rapid kinetics were encountered with rutin and luteolin 7-O glucoside with 0.1590 and 0.0744 min^{–1}, respectively. The analysis of the activation energies found by the Arrhenius law shows differences between the six flavonoids. Mesquitol needs 33.3 kJ/mol to be degraded, 51.4 kJ/mol for luteolin, 68.2 for eriodictyol, 100.6 for naringin, 107.3 for rutin, and 120 for luteolin 7-O glucoside. Activation energy corresponds to the quantity of energy needed to initiate the degradation reactions. The higher the activation energy, the more stable the flavonoid will be at high temperatures. Indeed, the flavonoid which is sensitive to a temperature of 30°C (mesquitol) needs only 33.3 kJ/mol, whereas the flavonoid sensitive to higher temperatures (rutin, luteolin 7-O glucoside) needs more than 100 kJ/mol. The differences observed between the kinetics of the degradation of the six flavonoids cannot be explained solely by their belonging to a given class of flavonoid. The structure of these molecules also seems to be at the origin of these differences. In fact, Buchner et al. (2006) explained that rutin is less sensitive to heat than quercetin because of the presence of a glycosyl moiety. With a view to elucidating the relation between the structure and heat sensitivity of these compounds, the structural characteristics and their kinetic parameters are summarized in Table 1. This table shows a difference between the glycosylated flavonoids and the aglycones. Indeed, activation energy was higher for the glycosylated: rutin (107 kJ/mol), naringin (100 kJ/mol), and luteolin 7-O glucoside (120 kJ/mol). This can be explained by the presence of a substituent, because additional energy is needed to break the osidic bond between

the heteroside and the flavonoid (Buchner et al., 2006; Da Costa, Barbosa Filho, Do Nascimento, & Macedo, 2002; Rohn, Buchner, Driemel, Rauser, & Kroh, 2007). However, as rutin is more sensitive to heat than naringin, the difference between the two could be explained by the presence of a double bond in the C-ring C for rutin, and additional energy is needed to break it. For the aglycon flavonoids, mesquitol has low activation energy in comparison to eriodictyol and luteolin. This can be explained by the absence of a carbonyl group for mesquitol, so the energy needed for its degradation will be lower. However, as the change (hydroxylation, glycosylation) in the structure of the six flavonoids takes place in different parts of the molecules, it is rather difficult to attribute the observed behavior to one substitution at a time.

3.3 | Antioxidant activity evolution

Before the heat treatment, the antioxidant activity of each flavonoid was characterized. Flavonoids having the highest antioxidant capacity are luteolin, luteolin-7-O-glucoside, and rutin. However, the capacities of the three compounds are different and equal to 5.56 ± 1.45, 4.21 ± 0.56, and 3.15 ± 0.35 mmol/l, respectively (Table 2). This behavior can be explained by the presence in these three compounds of the enone structure (2–3 double bond of the C-ring) conjugated with a carbonyl group in C4, which is missing in the structure of the three other flavonoids. It has been indicated that this structure is responsible for an increase of antioxidant activity (Heim et al., 2002). Among luteolin, luteolin 7-O-glucoside, and rutin, the aglycon flavonoid has a higher TEAC. These results showed that glycosylation or

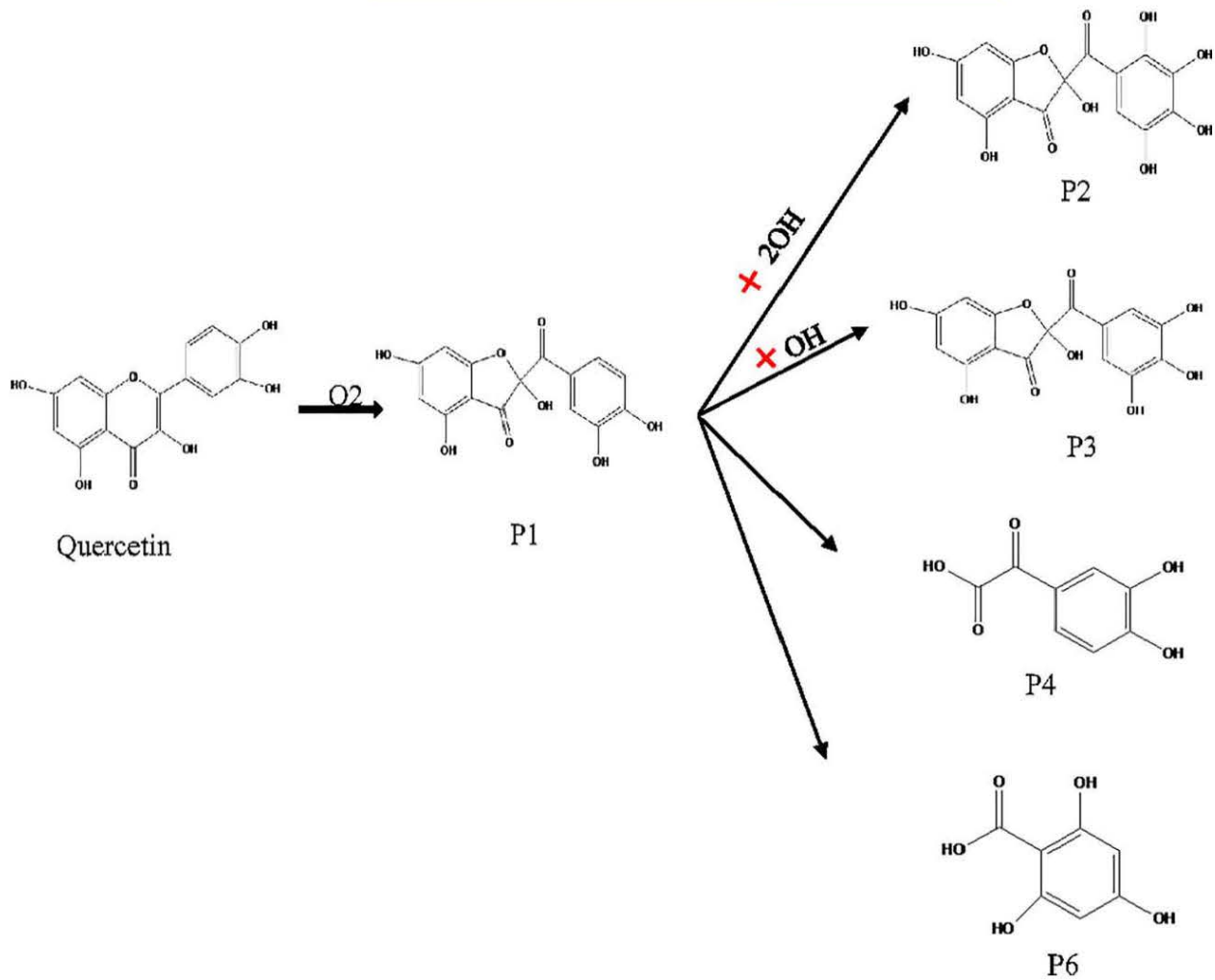


FIGURE 4 Thermal degradation pathway of quercetin

methylation provokes a significant decrease in antioxidant activity and particularly when the substitute is in position 3 (Van Acker et al., 1996). Indeed, the hydroxyl in position 3 confers antioxidant activity to molecules (Heim et al., 2002).

Eriodictyol, mesquitol, and naringin present, respectively, an antioxidant activity of 1.22 ± 0.06 , 0.92 ± 0.01 , and $0.17 \text{ mmol/l} \pm 0.03$. Naringin has a very low antioxidant activity in comparison to eriodictyol and mesquitol because of the glycosylation and the absence of the 3', 4'-catechol structure. It has been reported that the presence of two hydroxyl groups in position 3' and 4' on the B-ring increases flavonoid antioxidant activity (Heim et al., 2002). For eriodictyol and mesquitol, the presence of a hydroxyl group in position 3 does not counterbalance the absence of the enone structure. The number of hydroxyl groups seems to be at the origin of the high antioxidant activity of eriodictyol compared to mesquitol. Antioxidant activity of a flavonoid seems to be linked to some structural elements. All factors that change the flavonoid structure lead to an evolution of antioxidant activity. In Figure 3, the ΔTEAC is given according to heating time at different temperatures. For a given time (t_i), ΔTEAC (mmol trolox/l) is defined as the difference between the measured TEAC of the solution containing both residual flavonoid and product of degradation, and the predicted

TEAC, taking into account only the measured residual concentration of the flavonoid studied.

According to the evolution of ΔTEAC with time, three cases can be observed: (i) an increase of ΔTEAC shows that the products formed have an antioxidant activity that is higher than the native flavonoid; (ii) a decrease of ΔTEAC indicates a lower antioxidant activity of the degradation products; and (iii) a ΔTEAC constant means that degradation products have the same antioxidant activity as the native flavonoid.

For luteolin and luteolin 7-O glucoside, standard deviations range between 1 and 2, so there is no increase of ΔTEAC with temperature or heating time. Thus we can conclude that degradation products have an antioxidant activity that is similar to that of native flavonoids.

For the other flavonoids, standard deviations are low in comparison with TEAC values (inferior to 1), so we can state that there is an increase of ΔTEAC during the heat treatment. We notice that this increase is higher when temperature increases. So rutin, naringin, eriodictyol, and mesquitol lead to degradation products with an antioxidant activity. Similar findings were reported when rutin samples were heated to 100°C for 300 min. Despite the small amount of rutin left in the samples after thermal treatment, the solution still possessed antioxidant ability (Buchner et al., 2006).

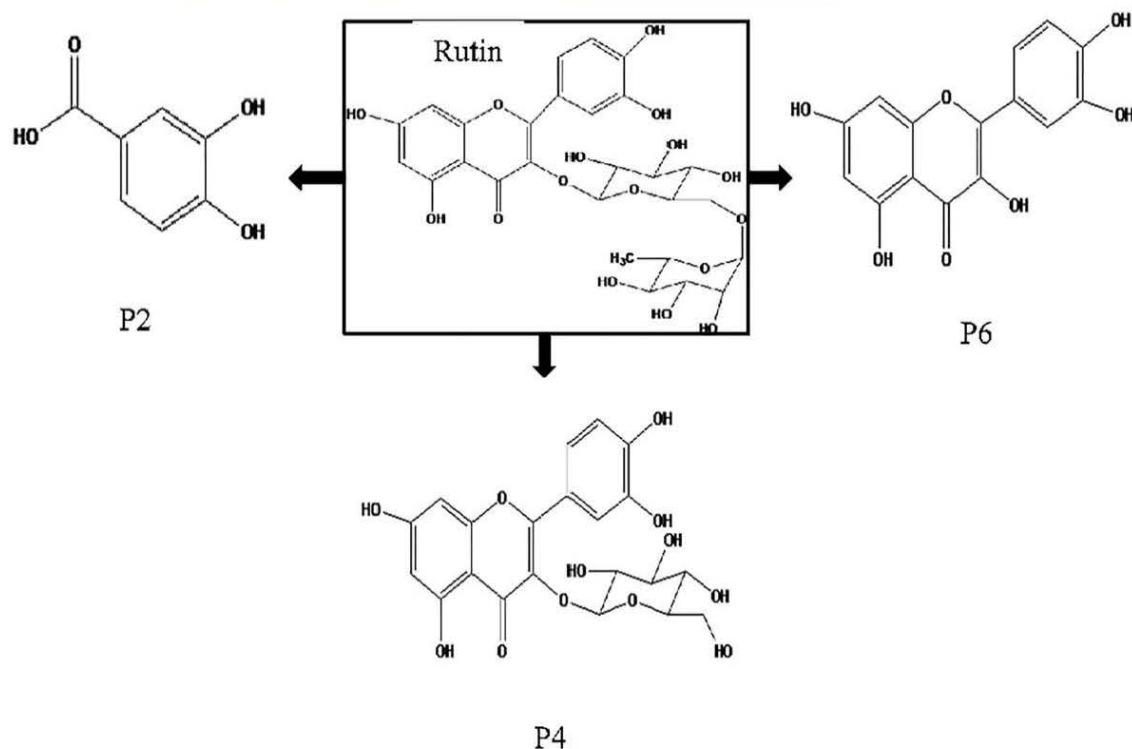


FIGURE 5 Thermal degradation pathway of rutin

Depending on the structure of the molecule and heat treatment behavior, the evolution of the antioxidant activity is different. For mesquitol, an increase of 200 at 130°C after 2 hr was observed, whereas for eriodictyol, the increase was only of 17 and 9 for naringin. Moreover, the antioxidant activity of rutin increased during the first hour of treatment then dropped progressively. This can be attributed to a sequential formation and degradation of the degradation compound during heat treatment.

3.4 | Identification of flavonoid degradation products

As explained before, the evolution of the antioxidant activity of the six flavonoids is different according to the flavonoid structure and the temperature of the thermal treatment. The few data available in the literature on the new formed products after flavonoid degradation indicated the existence of different degradation pathways leading to different new formed products (Dall'acqua et al., 2012; Ramešová et al., 2013). Thus, the new formed products would be different according to the kind of degradation (temperature, oxygen, light) and the structure of the native flavonoid. Results found on thermal degradation of quercetin (aglycon), rutin (glycosylated), and eriodictyol (aglycon without the enone structure) are in agreement with conclusions from the literature. The quercetin is considered as a reference because it has already been studied in the literature and it constitutes the aglycon part of rutin. To identify the new formed products, samples were taken at the end of the thermal treatment and analyzed by LC-MS.

3.4.1 | Identification of new formed products from quercetin degradation

The results obtained showed that quercetin is highly sensitive to temperature. The thermal degradation begins at low temperature during the step of solubilization. Products P1 (2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one), P2 ((3',4',5',6'-tetrahydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one), P3 ((3',4',5'-trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one) were obtained after solubilization at 35°C. During the thermal treatment (130°C, 2 hr), quercetin, P1, and P2 are totally degraded and lead to the formation of P4 (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-oxoacetic acid), P5 (unidentified product), P6 (2,4,6-trihydroxybenzoic acid), and P7 (unidentified product). The molar masses of the new formed products are summarized Table 3 and the quercetin degradation pathway is indicated in Figure 4. The chromatograms obtained by LC-MS are given in Annex materials.

A similar methodology was applied for the other two flavonoids.

3.4.2 | Identification of new formed products from rutin degradation

As for quercetin, the thermal degradation of rutin was assessed by LC-MS (chromatograms presented in Annex materials). It appears that after 2 hr of heating, six products were observed. Four molecules were identified: P2 (protocatechuic acid), P3 (dimer of rutin), P4 (quercetin-glucose), and P6 (quercetin). A degradation pathway is presented in Figure 5. For the dimer of rutin, different structures can be found (Anthoni, Chebil, Lionneton, Magdalou, Humeau, & Ghoul, 2011), they are proposed in Figure 6. These results indicated that the thermal degradation

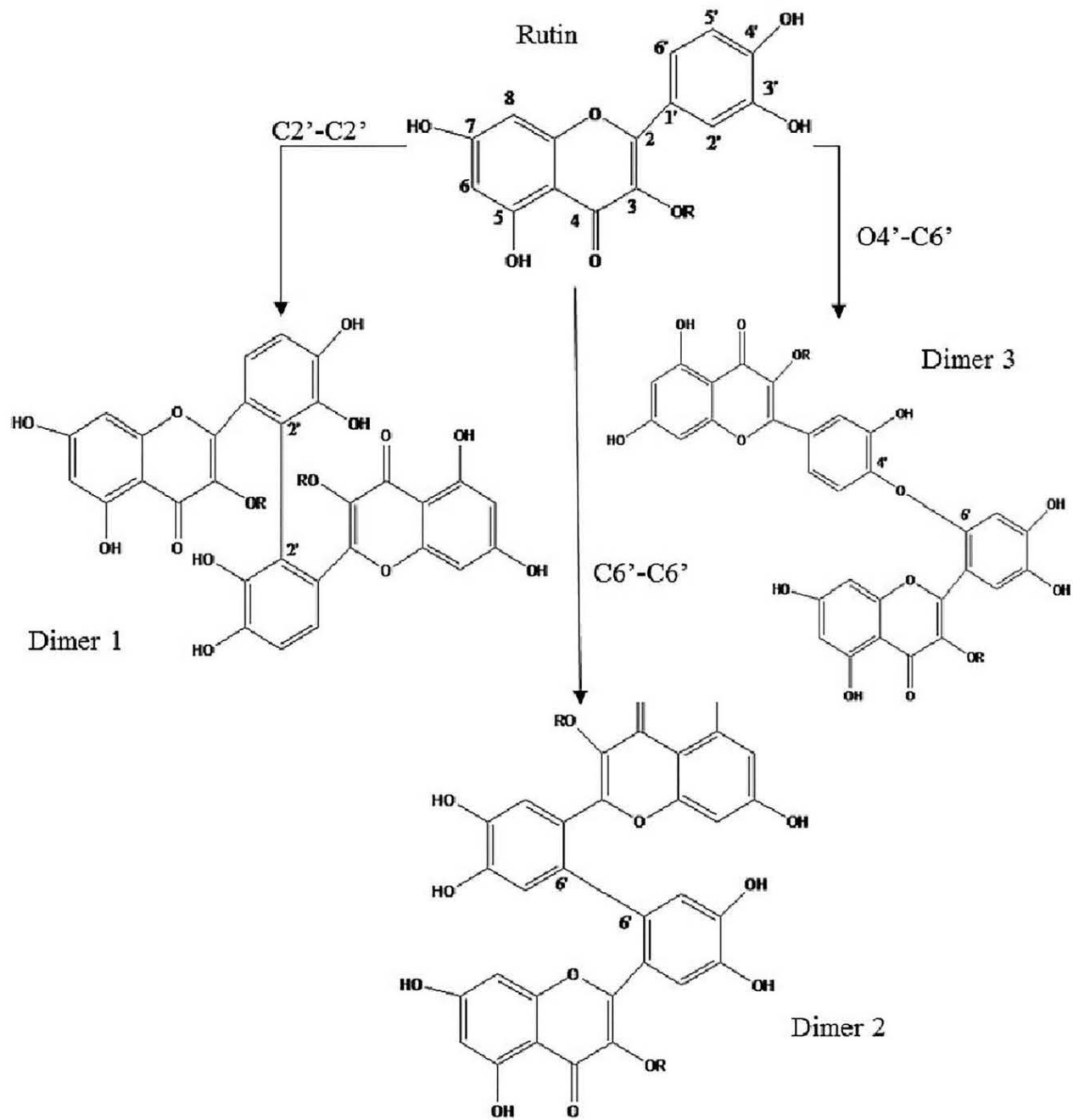


FIGURE 6 Structures of rutin dimer (Anthoni et al., 2011)

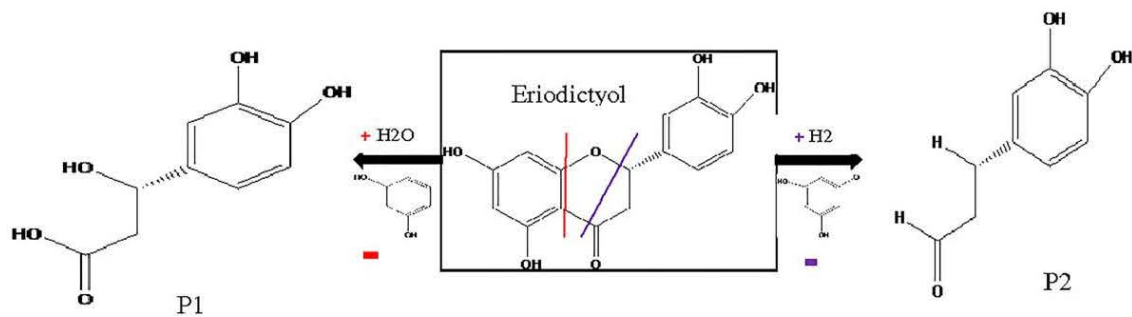


FIGURE 7 Thermal degradation pathway of eriodictyol

pathway of quercetin and rutin are not similar despite the presence of genin in the two structures.

3.4.3 | Identification of new formed products from eriodictyol degradation

The chromatograms of the thermal degradation of eriodictyol are indicated in Annex materials. The molar masses of the different by-products are summarized in Table 3. After 2 hr of thermal treatment, three products P1 (3-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-hydroxypropanoic acid), P2 (3-(3,4-dihydroxyphenyl) propanal), and P3 (unidentified product) were observed. A thermal degradation pathway is shown in Figure 7.

4 | CONCLUSION

Temperature has an effect on the stability of flavonoids and their biological activity. According to their structure, flavonoids are more or less sensitive to heat treatment. Glycosylated flavonoids are more resistant to heat treatment than aglycon flavonoids. The degradation depends on structural solidity. Therefore, a double bond needs more energy in order to be degraded. Modifications of structure lead to changes in antioxidant activity. According to the degradation products synthesized: (i) antioxidant activity can decrease, which means that degradation products have a lower antioxidant activity, (ii) antioxidant activity remains constant, indicating that degradation products have the same antioxidant activity as native flavonoids, and (iii) antioxidant activity can increase, so the degradation products have a higher antioxidant activity. Degradation products of three flavonoids were identified and we concluded that the thermal degradation pathways are different according to the structure of the flavonoid. The new formed products exhibit residual antioxidant activity sometimes superior to that of native molecules.

REFERENCES

- Anthoni, J., Chebil, L., Lionneton, F., Magdalou, J., Humeau, C., & Ghoul, M. (2011). Automated analysis of synthesized oligorutin and oligoes-culin by laccase. *Canadian Journal of Chemistry*, *89*, 964–970.
- Bordiga, M., Travaglia, F., Mazza, G., & Arlorio, M. (2015). Evaluation of the effect of processing on cocoa polyphenols: Antiradical activity, anthocyanins and procyanidins profiling from raw beans to chocolate. *International Journal of Food Science and Technology*, *50*, 840–848.
- Buchner, N., Krumbein, A., Rhon, S., & Kroh, L. W. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *20*, 3229–3235.
- Da Costa, E. M., Barbosa Filho, J. M., Do Nascimento, T. G., & Macedo, R. O. (2002). Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. *Thermochim Acta*, *392–393*, 79–84.
- Dall'acqua, S., Miolo, G., Innocenti, G., & Caferi, S. (2012). The photodegradation of quercetin: Relation to oxidation. *Molecules*, *17*, 8898–8907.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*, 572–584.
- Mellor, D. D., & Naumovski, N. (2016). Effect of cocoa in diabetes: The potential of the pancreas and liver as key target organs, more than

an antioxidant effect? *International Journal of Food Science and Technology*, *51*, 829–841.

- Nayak, B., Liu, R. H., & Tang, J. (2015). Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains—A review. *Critical Reviews in Food Science*, *55*, 887–918.
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods: Mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, *21*, 3–11.
- Ramešová, S., Sokolová, R., Terábek, J., & Degano, I. (2013). The oxidation of luteolin, the natural flavonoid dye. *Electrochimica Acta*, *110*, 646–654.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*, 1231–1237.
- 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*, 933–956.
- Rohn, S., Buchner, N., Driemel, G., Rauser, M., & Kroh, L. W. (2007). Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1568–1573.
- Saikia, S., Mahnot, N. K., & Mahanta, N. L. (2016). A comparative study on the effect of conventional thermal pasteurisation, microwave and ultrasound treatments on the antioxidant activity of five fruit juices. *Food Science and Technology International*, *22*, 288–301.
- Sirmah, P., Dumarcay, S., Masson, E., & Gerardin, P. (2009). Unusual amount of (–) mesquitol from the heartwood of *Prosopis juliflora*. *Natural Product Research*, *23*, 183–189.
- Stintzing, F. C., Hoffmann, M., & Carle, R. (2006). Thermal degradation kinetics of isoflavone aglycones from soy and red clover. *Molecular Nutrition & Food Research*, *50*, 373–377.
- Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F., & Gil, M. I. (2000). Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during post-harvest storage and processing. In Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in natural products chemistry*, *23*, (pp. 739–795). Elsevier Science, Amsterdam.
- Ungar, Y., Osundahunsi, O. F., & Shimoni, Y. (2003). Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 4394–4399.
- Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D. J., Tromp, M. L. N. J. L., Griffioen, D. S. E. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*, 331–342.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Chaaban H, Ioannou I, Chebil L, et al. Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *J. Food Process. Preserv.* 2017;00:e13203. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13203>

1.1.2. Contribution de l'article

Dans cet article, il a été montré que les flavonoïdes sont sensibles à un traitement thermique dans des conditions isothermes. Pour chaque molécule, l'intensité de la dégradation augmente avec le temps et la température de traitement. Les cinétiques de dégradation des flavonoïdes à la chaleur ont été modélisées par une réaction d'ordre 1. La dépendance entre les constantes de vitesse et les températures de traitement ont été modélisées par la loi d'Arrhénius. Des différences significatives sur les vitesses de dégradation, les énergies d'activation et les températures de début de dégradation sont constatées entre les molécules. Celles-ci s'expliquent par des différences de structure entre les flavonoïdes.

Le premier critère structural de stabilité est la présence d'un groupement osidique sur le flavonoïde. En effet, les flavonoïdes glycosylés (la rutine, la naringine et la lutéoline 7-O glucoside) débutent leur dégradation à une température plus élevée que les flavonoïdes aglycones (l'ériodictyol, le mesquitol et la lutéoline). Les températures de début de dégradation sont de 50°C pour le mesquitol, de 70°C pour l'ériodictyol, la lutéoline, la rutine et la lutéoline 7-O glucoside et de 100°C pour la naringine. Le deuxième critère structural de stabilité est le degré d'hydroxylation. La naringine (deux groupes hydroxyles) est moins sensible à la température que la rutine (quatre groupes hydroxyles) et la lutéoline 7-O glucoside (trois groupes hydroxyles) en raison de la différence du degré d'hydroxylation entre ces composés. Le troisième critère structural de stabilité est la présence du groupe carbonyle sur le cycle C. En effet, le mesquitol dépourvu de cet élément structural est très sensible à la chaleur par rapport à l'ériodictyol et à la lutéoline possédant tous les deux un groupe carbonyle.

Les énergies d'activation calculées sont pour le mesquitol (33 kJ/mol), la lutéoline (51 kJ/mol), l'ériodictyol (68 kJ/mol), la naringine (101 kJ/mol), la rutine (107 kJ/mol) et la lutéoline 7-O glucoside (120 kJ/mol). Les flavonoïdes glycosylés ont besoin d'une énergie plus élevée pour se dégrader que les flavonoïdes aglycones. En effet, plus il y aura de liaisons covalentes à détruire (liaisons de nature osidique entre le flavonoïde et le groupement glycosyle, double liaison énone, groupement carbonyle), plus l'énergie nécessaire devra être élevée.

Concernant l'activité anti-oxydante, l'observation des cinétiques d'évolution du Δ TEAC des solutions de flavonoïdes traitées a permis de conclure que les produits de dégradation de la rutine, de la naringine, du mesquitol et de l'ériodictyol ont également une activité anti-oxydante. L'identification des structures des produits de dégradation par traitement thermique permettent de conclure que les voies de dégradation sont différentes selon la structure du flavonoïde. En effet, les flavonoïdes aglycones (ériodictyol, quercétine) se dégradent par

ouverture du cycle C tandis que la rutine (flavonoïde glycosylé) se polymérise durant sa dégradation par la température.

1.2. Effet des procédés thermiques dans des conditions non isothermes

1.2.1. Introduction

Précédemment, nous avons étudié l'effet d'un procédé thermique dans des conditions isothermes sur le devenir des flavonoïdes et l'évolution de leur activité anti-oxydante. Afin de déterminer si l'intensité des dégradations dépend du mode de chauffage utilisé, nous étudions dans cette partie l'effet d'un procédé thermique dans des conditions non isothermes. Il s'agit d'utiliser un microcalorimètre permettant le chauffage des solutions de flavonoïdes selon un gradient de température (de 25 à 130°C avec un incrément de 4°C/h). Seuls la rutine, la naringine, le mesquitol et l'ériodictyol ont pu être étudiés car la lutéoline et la lutéoline 7-O glucoside ont des solubilités trop faibles pour émettre un signal détectable par le microcalorimètre. Deux solvants ont été utilisés : de l'eau et un mélange eau/propylène glycol (10%). Les constantes de vitesses, l'enthalpie des réactions de dégradation et les énergies d'activation ont été déterminées pour chaque molécule et pour chaque solvant. Une comparaison a été réalisée avec les résultats obtenus dans des conditions isothermes. Cette partie fait l'objet d'un article soumis intitulé "Thermal stability of rutin, naringin, mesquitol and eriodictyol and the effect on their antioxidant activity" »

**Thermal stability of rutin, naringin, mesquitol and eriodictyol and the effect on their
antioxidant activity**

Hind Chaaban ¹, Irina Ioannou ^{1*}, Céline Charbonnel ¹, Alexandre Kriznik ², Leila Chekir³
and Mohamed Ghoul ¹

¹ University of Lorraine – Laboratory of biomolecules engineering (LIBio)

2 avenue de la Forêt de Haye – TSA 40602 54518 VANDOEUVRE CEDEX FRANCE

E-mail : firstname.lastname@univ-lorraine.fr

² University of Lorraine – Biopôle

9 avenue de la Forêt de Haye – BP 184 54505 VANDOEUVRE CEDEX France

³ Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Dental Medicine, University of
Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisia

* Corresponding author

E-mail : irina.ioannou@univ-lorraine.fr

Phone: + 33 (0)3-83-59-58-14

Abstract:

The thermal stability under isothermal and non-isothermal conditions of four flavonoids belonging to aglycon (eriodictyol and mesquitol) and glycosylated forms (rutin, naringin) was investigated in water and water with 10% of propylene glycol. Glycosylated flavonoids exhibit higher stability compared with aglycon ones. Among the glycosylated flavonoids, rutin is more sensitive to heat than naringin due to the different degree of hydroxylation between these two compounds. For the aglycon form, sensitivity to heat varies depending on the absence or presence of a carbonyl group in C4. The addition of 10% of propylene glycol leads to a protective effect which delays the thermal degradation of the flavonoids. The activation energies are also affected by both the structure of the flavonoid and the mode of heat treatment. Naringin (101 kJ/mol) and rutin (78 kJ/mol) which are glycosylated flavonoids need high energies to provoke their degradation compared to the aglycon form mesquitol (33kJ/mol) and eriodictyol (68 kJ/mol). The difference observed on the kinetic parameters between isothermal and non-isothermal treatments can be attributed to the different intensity of heating which can generate a difference in the composition of the solution. The variation of the composition is known to affect activation energy and antioxidant activity.

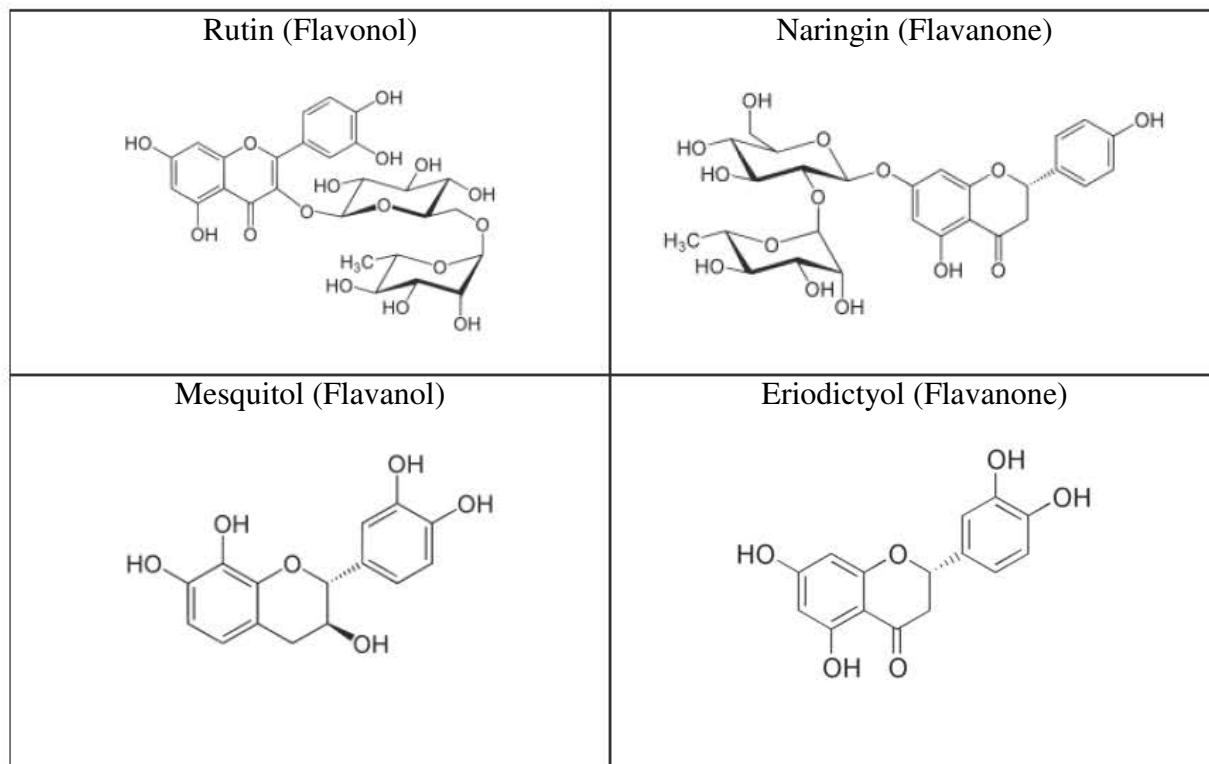
Key words: Thermal stability, flavonoid, calorimetry, kinetic parameters

1. INTRODUCTION

Flavonoids are antioxidant molecules widespread in fruit and vegetables. Recent epidemiological studies have shown that a diet of fruit and vegetables rich in flavonoids leads to a general well-being of consumers. This is attributed to biological activities of flavonoids particularly their antioxidant activity. In fact, Tomás-Barberán et al. [1] reported that foods rich in flavonoids reduce specific diseases such as diabetes, cancer, cardiovascular or neuronal diseases. Numerous studies have dealt with the quantification of flavonoid contents and of their activities in raw food. However, the human diet is mainly based on the consumption of products having undergone heat treatment during their transformation from raw materials to finished products. The behavior of flavonoids after processing and their incorporation into a food matrix has scarcely been studied. A recent review on this subject realized by Ioannou et al. [2] revealed that food processing induces a severe degradation of flavonoids and consequently a modification of their antioxidant activities. However, the intensity of the degradation seemed to change depending on the composition of the food matrix and on the structure of the flavonoids. Indeed, several authors indicated that glycosylated flavonols are less sensitive to heat treatment than aglycon ones [3], [4] and [5]. However, Murakami et al. [6] indicated that luteolin 7-O glucoside is more sensitive when heated to a temperature of 100°C compared to aglycon luteolin. Moreover, Ungar et al. [7] observed that for a given aglycon isoflavone, the sensitivity to heat treatment is variable depending on the degree of hydroxylation. The objective of this paper is to investigate the stability under isothermal and non-isothermal conditions of four flavonoids belonging to aglycon and glycosylated forms. These compounds are a glycosyl flavonol (rutin), a glycosyl flavanone (naringin), an aglycon flavanone (eriodictyol) and an aglycon flavon-3-ol (mesquitol) (Figure1). The four flavonoids were prepared in water and water with 10 % of propylene glycol. These solutions were submitted to two modes of heating under a wide range of temperatures varying from 30 to 130 °C. The recorded profiles were used

to compare the rate of degradation and activation energy. The residual antioxidant activity of the solutions was also evaluated.

Figure 1: Structure of the four flavonoids studied



2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals.

Rutin was obtained from Alfa Aesar, naringin was supplied by Sigma-Aldrich, eriodictyol was purchased from Extrasynthese. Mesquitol was extracted from a Kenya tree *prophis juliflora*. 2'-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) was purchased from Sigma-Aldrich Chemical. Trolox and potassium persulfate were purchased from Fulka. Ethanol was obtained from VWR. Propylene glycol was obtained from Amresco. Methanol was purchased from Carlo Erba. All reagents and solvents were of analytical grade.

2.2. Flavonoid solutions

Solutions of flavonoids were prepared according to their solubility: naringin 0.04 mM, rutin 0.04mM, mesquitol 0.08mM and eriodictyol 0.08mM. Two solvents were used to prepare these solutions: 100% water and a mix of water and propylene glycol (90/10%). For the preparation of water solutions, flavonoids were dissolved in water at a temperature of 25°C for one half hours in the dark using stirring (600 rpm). For the preparation of propylene glycol model solutions, flavonoids were dissolved in propylene glycol for 10 min, then water was added to obtain a proportion of 90% of water. The mix was agitated (600rpm) in the dark at a temperature of 25°C for a total duration of one hour and half.

2.3. Thermal treatment under isothermal conditions

Flavonoid solutions were heated from 30°C to 130°C for two hours in an oil-based bath (Hubert, W8518D). Samples were taken every 15min and cooled to a temperature of 30°C. Then, samples were analyzed by HPLC. Residual concentrations were plotted according to heating time.

Different models were tested to fit the kinetics of degradation of the flavonoids, however, only the model of order 1 allows coefficients of determination superior to 0.9 to be obtained. Thus, equation 1 was used to calculate the constant rates of the degradation reactions (k).

$$\ln(C/C_0) = -kt \quad \text{Equation 1}$$

where C_0 is the initial flavonoid content, and C_t the flavonoid content after t minutes of heating at a given temperature, k is the reaction rate constant (min^{-1}).

The Arrhenius model (equation 2) was used for activation energy determination:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{Ea}{RT} \quad \text{Equation 2}$$

2.4. Thermal treatment under non-isothermal conditions

A VP-DSC microcalorimeter (VPDSC expanded range microcalorimeter, Microcal) was used to perform the microcalorimetry analyses. Model solutions are degassed over 8 minutes (Thermovacsample degassing and thermostat, Microcal Inc., vacuum), then, 1 mL was injected into the microcalorimeter cell. Samples were scanned by temperature ramping from 30 to 125°C at a scanning rate of 4°C/h. Analysis of the data was performed by the Origin 7.0 software package (Microcal), and heat capacities (ΔCp) were obtained for every temperature (kcal/mol.°C). Enthalpies (ΔH) of the degradation reactions were calculated after subtraction of the sample from the reference.

Constant rates at each temperature were determined according to equation 3:

$$k_{T,av} = - \frac{\Delta A / \Delta t}{A_{av}} \quad \text{Equation 3}$$

where ΔA is the change in flavonoid concentration at each time interval (equation 4), Δt is the total time of the microcalorimetry analysis and A_{av} is the average flavonoid concentration during each time interval (equation 5).

$$\Delta A = \left(\frac{\Delta H}{H_T} \right) \times \Delta A_T \quad \text{Equation 4}$$

where ΔH is the change in enthalpy within the time interval (kcal/mol), H_T is the total enthalpy of the degradation reaction and ΔA_T is the degraded amount of flavonoid measured by HPLC.

$$A_{av} = \left[1 - \frac{\left(\frac{H_2 + H_1}{2} \right)}{H_T} \right] \times \Delta A_T \quad \text{Equation 5}$$

H1 and H2 are the partial decomposition enthalpies for the beginning and the end of each time interval.

The Arrhenius model was then used to calculate the activation energy.

2.5. HPLC/DAD Analysis

HPLC analysis was carried out using an Elite Lachrom HPLC system (VWR HITACHI) which consisted of (L-2455) a diode-array detector, (L-2200) an autosampler and (L-2130) a quaternary pump coupled to a column C18 (150x4.6 mm) (Grace). The mobile phases were water (phase A) and methanol (phase B). Separation was achieved by elution gradient using an initial composition of 95% water and 5% methanol, then the percentage of methanol was raised to 100% for 10 min and finally methanol dropped to 5% after 20 min. The total running time was 30 min. The injection volume was 50 μ L. A flux of 1 mL/min and a temperature of 50 °C were used. Chromatograms were obtained at 254, 280 and 350 nm.

2.6. Antioxidant activity assay

The antioxidant activity was measured by the ABTS method described by Re et al. [8], with some modifications for use in microplates. The ABTS assays were performed with a spectrofluorimeter SAFAS (Xenius) equipped with a 96-well polystyrene plate. Scavenging free radical potentials were tested in an aqueous solution of ABTS^{•+}. The percentage of inhibition was calculated with equation 6.

$$(IP\%) = 100 \times (A_C - A_S) / A_C \quad \text{Equation 6}$$

where A_C and A_S are the absorbance of the control and of the test sample, respectively.

Then TEAC was determined according to equation 7.

$$TEAC = \frac{a_S}{a_T} \quad \text{Equation 7}$$

a_S : line slope of the percentage of inhibition plotted vs. concentration (μ M) for the sample.

a_T : line slope of percentage of inhibition plotted vs. concentration (μ M) for Trolox reference.

2.7. Data Analysis

All kinetic experiments were performed in triplicate. Averages are calculated as well as standard deviations, which are not represented in order not to overload the graphs. The Origin

7.0 software package (Microcal) and SciDAVis were used to analyze calorimetric data. The software SigmaPlot was used to model the kinetic degradations. Statistical analysis was performed on data with Ri386 3.0.2 freeware to show significant differences ($p < 0.5$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The degradation of rutin, naringin, eriodictyol and mesquitol were studied under isothermal and under non isothermal procedures in water and in water with 10 % of propylene glycol. Residual concentrations, antioxidant activities, constant rates and activation energies were evaluated under these two operating conditions.

3.1 The kinetics of degradation of flavonoids under isothermal conditions

The degradation kinetics of flavonoids in water and in the presence of 10 % of propylene glycol are presented in figures 2a and 2 b respectively.

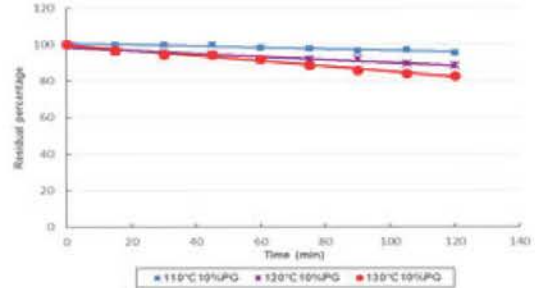
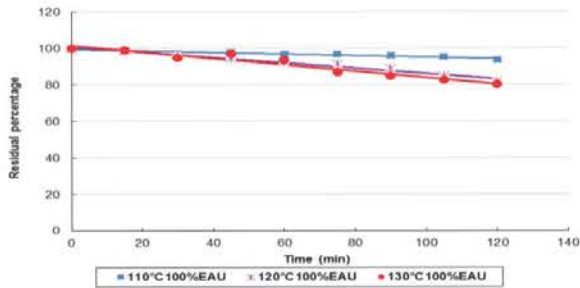
These results indicated that naringin is the least sensitive to heat treatment compared to the three other studied molecules. In fact, the degradation of naringin in water starts only when the temperature is at least equal to 110 °C. At this set point of temperature and even after 2 h of treatment more than 90% of naringin remains in solution. For the higher temperature of 130°C only 20% of naringin were lost. The presence of the propylene glycol does not affect the kinetic behavior of the naringin. Unlike naringin, mesquitol is the most sensitive compound with 32 % of degradation even at 50 °C and 93 % at 130 °C. For this compound, the addition of 10 % of propylene glycol seems to play a protective role for temperatures below 100°C (50, 70, 90°C). This effect becomes non-significant for higher temperatures. For eriodictyol, the effect of temperature is observed from 70 °C with 18 % of loss; the concentration falls to zero after 80 min of incubation at 130°C. The presence of 10% of propylene glycol in solution has like mesquitol, a protective effect. Indeed, for the temperatures 70, 90, 110 and 130 °C, 82, 59, 24 and 0% of flavonoid remain in water, whereas 91, 79, 38 and 6% of eriodictyol remain in propylene glycol (10%).

(a) Flavonoid in water

(b) Flavonoid in 90% water/10% propylene glycol

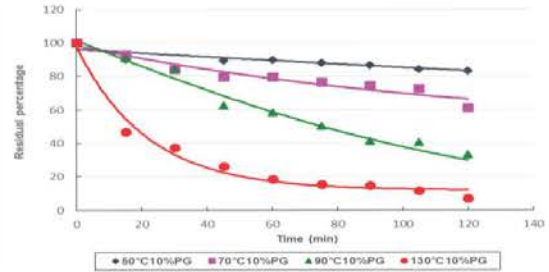
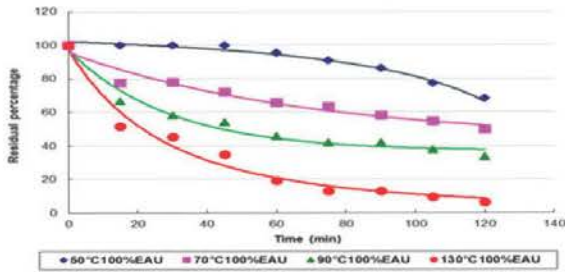
Naringin

Naringin



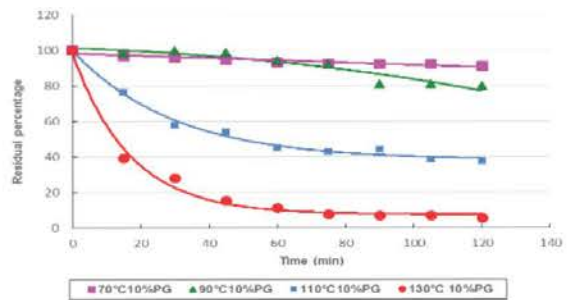
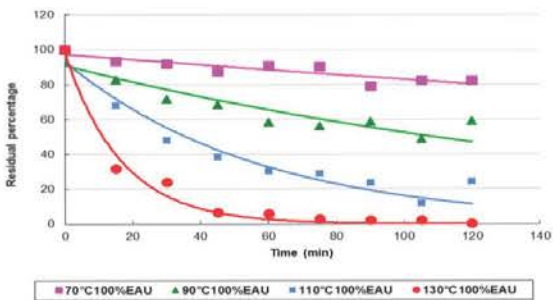
Mesquitol

Mesquitol



Eriodictyol

Eriodictyol



Rutin

Rutin

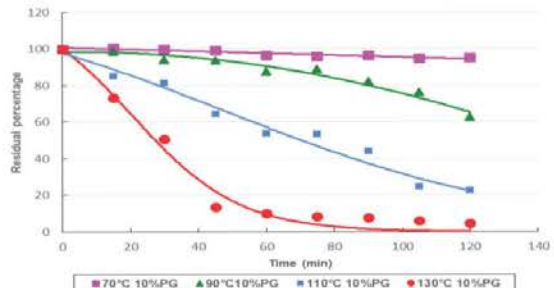
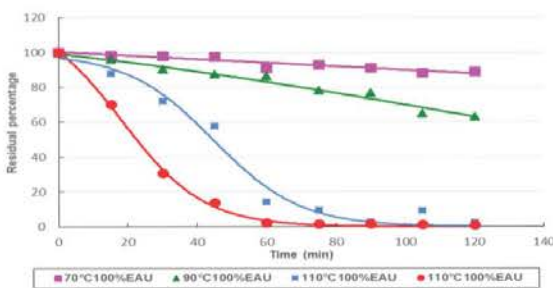


Figure 2: Degradation kinetics of flavonoids at different temperatures over 2 hours

The evolution of the residual concentration of rutin, exhibits two behaviors, a linear degradation for temperatures below 100°C and an exponential degradation for higher temperatures. The propylene glycol slightly decreases the effect of temperature. These results indicate that whatever the heating temperature, either the final residual concentration is higher or the degradation rate is lower in the presence of propylene glycol. So, it seems that the propylene glycol delays the flavonoid denaturation during heat treatment due to its protective effect.

The observed difference in sensitivity among the 4 flavonoids can be explained by the differences in their structures such as the presence or absence of a glycosyl group, the degree of hydroxylation and number of double bonds. Our results indicated that glycosylated flavonoids (naringin, rutin) are less sensitive to heat than the aglycons (eriodictyol, mesquitol). These results are in agreement with the data reported by [3] and [5]. These authors showed that rutin is less sensitive to heat than its aglycon equivalent quercetin. Our results also indicated that rutin is more sensitive to heat treatment than naringin even though these two compounds are both glycosylated. This behavior can be attributed to the degree of hydroxylation. The most hydroxylated compounds are more affected by heat treatment. Ungar et al. [7] observed a similar phenomenon during their studies of two isoflavones having different degrees of hydroxylation. For aglycon compounds, sensitivity is not only related to the degree of hydroxylation, but also to the presence of a carbonyl group on C4. Indeed, the flavonoids having a hydroxyl on C3 are also highly affected by temperature, oxygen and light [9]. This can explain the high sensitivity of mesquitol compared to eriodictyol.

3.1.2. Kinetic parameters of the flavonoid degradation

As is indicated in paragraph 2.3 the best correlation of the degradation kinetics was obtained by a model of first order. Thus, constant rates of degradation are determined by plotting $\ln(C/C_0)$ according to heating time. Arrhenius law is then applied to find the activation energy

of degradation for each flavonoid. Table 1 shows the constant rates and the activation energies after a heating of two hours.

Table 1: Kinetic parameters of rutin, naringin, eriodictyol and mesquitol during thermal degradation

Flavonoid	Naringin		Eriodictyol	
	In 100% water	In 10% PG	In 100% water	In 10% PG
T (°C)	k (min ⁻¹)	k (min ⁻¹)	k (min ⁻¹)	k (min ⁻¹)
70	nd	nd	0.0017 ± 0.0001	0.0009 ± 0.0001
90	nd	nd	0.0073 ± 0.0002	0.0017 ± 0.0001
110	0.0004 ± 0.0001	0.0003 ± 0.0001	0.0187 ± 0.0004	0.0098 ± 0.0002
120	0.0016 ± 0.0001	0.0011 ± 0.0001	ni	ni
130	0.0019 ± 0.0001	0.0016 ± 0.0001	0.0469 ± 0.0011	0.0289 ± 0.0007
Ea (kJ/mol)	101 ± 10	108 ± 10	68 ± 2	69 ± 1
Flavonoid	Mesquitol		Rutin	
	In 100% water	In 10% PG	In 100% water	In 10% PG
T (°C)	k (min ⁻¹)	k (min ⁻¹)	k (min ⁻¹)	k (min ⁻¹)
50	0.0020 ± 0.0001	0.0017 ± 0.0001	nd	nd
70	0.0061 ± 0.0002	0.0037 ± 0.0002	0.001 ± 0.0001	0.0005 ± 0.0001
90	0.0104 ± 0.0002	0.0091 ± 0.0002	0.0037 ± 0.0001	0.0027 ± 0.0001
110	ni	ni	0.0316 ± 0.0007	0.0116 ± 0.0003
130	0.0236 ± 0.0006	0.0232 ± 0.0005	0.0444 ± 0.0011	0.0291 ± 0.0007
Ea (kJ/mol)	33 ± 2	36 ± 2	78 ± 2	79 ± 2

nd: not degraded ; ni: not investigated

Naringin in 100% water shows a starting degradation at 110°C, its degradation constant rate at 130°C is low (0.0019 min⁻¹). The denaturation of the rutin and the eriodictyol in 100% water is observed at a temperature of 70°C. Rutin shows two profiles of degradation: slowly below 100°C (0.0037 min⁻¹ at 90°C) and more rapidly above 100°C (0.0316 min⁻¹ at 110°C).

Mesquitol is the most sensitive, its denaturation appears at a temperature of 50 °C. However at 130°C, the mesquitol degradation constant rate (0.0236 min^{-1}) is lower than the rutin degradation constant rate (0.0444 min^{-1}). These phenomena can be explained by the difference of flavonoid structure. In fact, naringin and rutin which are glycosylated flavonoids need high energies to degrade: 78 kJ/mol for rutin and 101 kJ/mol for naringin. This high energy can be attributed to the presence of the glycosylated groups.

For the other flavonoids, activation energies are weaker. It is almost 68 kJ/mol for eriodictyol due to the presence of the carbonyl group in C4 and 33 kJ/mol for mesquitol. Thus it appears clearly that flavonoids with high activation energy are characterized by a high starting temperature of degradation.

All the constant rates are significantly lower in propylene glycol than in 100% water, except for naringin (110°C) and for mesquitol (130°C). However, the activation energies are of the same order of magnitude for the two solvents. This phenomenon can be explained by the fact that the activation energy represents the energy necessary to break covalent bonds. The addition of propylene glycol in solution increases only the number of non-covalent bonds with flavonoids (Van der Waals interaction, hydrogen bonds) without affecting the number of covalent bonds.

3.2. Thermal treatment under non-isothermal conditions

To characterize the degradation of the four flavonoids presented previously, the calorimetric technique was used to induce a heat treatment from 30°C to 125°C with an increment of 4°C per hour. The heat generated by the degradation of each compound was recorded throughout along the treatment. The obtained profiles were used to identify the temperature from which flavonoid degradation begins, the calculation of the enthalpies of the degradation reactions and the constant rate of the degradation. Thus, activation energies are determined by the use of Arrhenius law.

3.2.1. Scans obtained by microcalorimetry

In figure 3, the evolution of heat capacity (C_p) according to time is plotted for each molecule in water and in propylene glycol (10%). The naringin scan indicates that this molecule remains stable between 30 and 125°C. For rutin, mesquitol and eriodictyol, their scans exhibit a large exothermic peak which indicates that a degradation reaction occurs under these conditions. The degradation of rutin starts at a temperature of 67°C and 82°C respectively in water and with 10% propylene glycol. The degradation reactions reach their maximum at 98°C in 100% water and 115°C in 10% propylene glycol. The two peaks are similar with a shift of 15°C. For eriodictyol, the reactions start at a temperature of 60°C for the two solutions, however, like for rutin, the maximum rate of degradation is reached at 105°C in the presence of water and 111°C with 10% of propylene glycol. Mesquitol is the most sensitive molecule whose degradation starts at 50°C and the maxima are reached at a temperature of 94°C for the both solutions tested. These results indicate that the sensitivity to this mode of heat treatment is variable depending on the structure of the molecule, as discussed above.

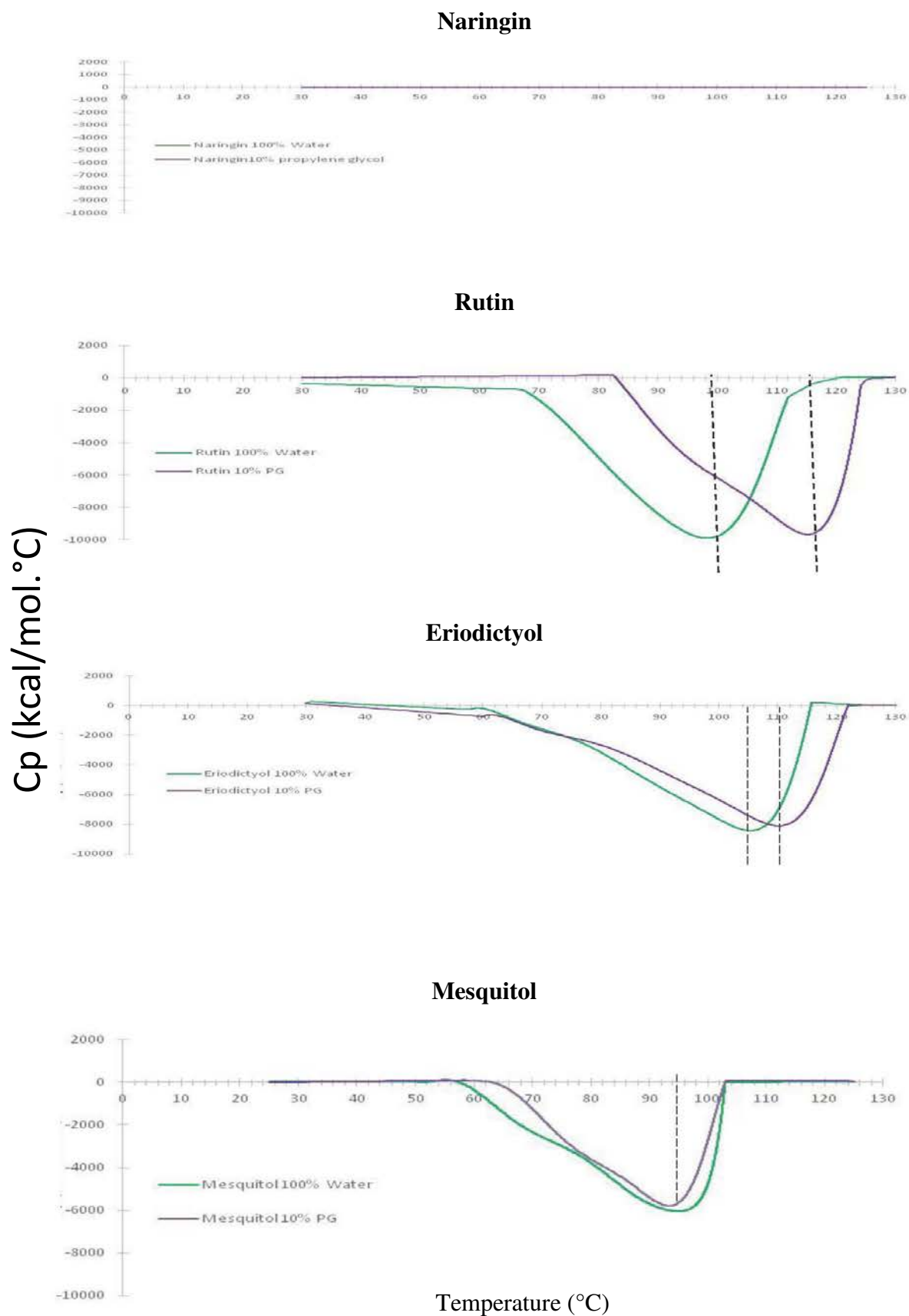


Figure 3: Scans of naringin, rutin, eriodictyol and mesquitol during microcalorimetric stability tests

3.2.2. Kinetic parameter determination

At the end of each thermal analysis, the final flavonoid concentration was determined by HPLC. The measured enthalpies were normalized for the actual amount of flavonoid being degraded. The kinetic parameters calculated (residual concentrations, ΔH and activation energies) are presented in table 2.

Table 2. Enthalpy change and activation energies of flavonoid degradation as determined by microcalorimetry

Flavonoids	Water 100%			PG 10%		
	RC %	ΔH (kJ/mol)	Ea (kJ/mol)	RC %	ΔH (kJ/mol)	Ea (kJ/mol)
Rutin	1 \pm 2	1085 \pm 40	61 \pm 5	13 \pm 2	893 \pm 92	66 \pm 4
Eriodictyol	0 \pm 2	1022 \pm 38	57 \pm 10	13 \pm 2	1079 \pm 39	62 \pm 12
Mesquitol	3 \pm 2	663 \pm 24	58 \pm 3	7 \pm 2	528 \pm 20	55 \pm 2

RC : residual concentration of flavonoid

These results indicate that the flavonoids in solution with 10 % of propylene glycol are less sensitive to heat treatment than in water. In fact, the residual concentrations are respectively 13% of rutin, 13% of eriodictyol and 7% of mesquitol against 1%, 0% and 3 % in water. These results are in accordance with those observed under isothermal conditions. So, it can be concluded that propylene glycol has a protective effect on flavonoids during heat treatment.

The areas of the exothermal peaks were used to calculate ΔH . For mesquitol, the corresponding enthalpies are respectively 663 and 528 kJ/mol in water and in 10% propylene glycol. For eriodictyol, the ΔH are comparable for the two solutions and equal respectively to 1022 and 1079 kJ/mol. In the case of rutin, the ΔH are respectively 1085 and 893 kJ/mol. These values indicate that, whatever the solution used, the lowest enthalpy of degradation is reached in the presence of mesquitol. For rutin and eriodictyol, the ΔH present similar magnitude except for rutin in 10% propylene glycol.

The constant rates of degradation were determined in a range of temperature in which an exponential increase for degradation rate was observed. The calculated degradation constant rates were used to plot $\ln k$ vs $1/T$ and the activation energies were calculated according to Arrhenius equation. Good determination coefficients were obtained for all the conditions ($R^2 > 0.9$), figure 4 shows an example of determination. The activation energies were of the same order of magnitude whatever the solvent used; statistical analysis shows non-significant differences between the different values obtained.

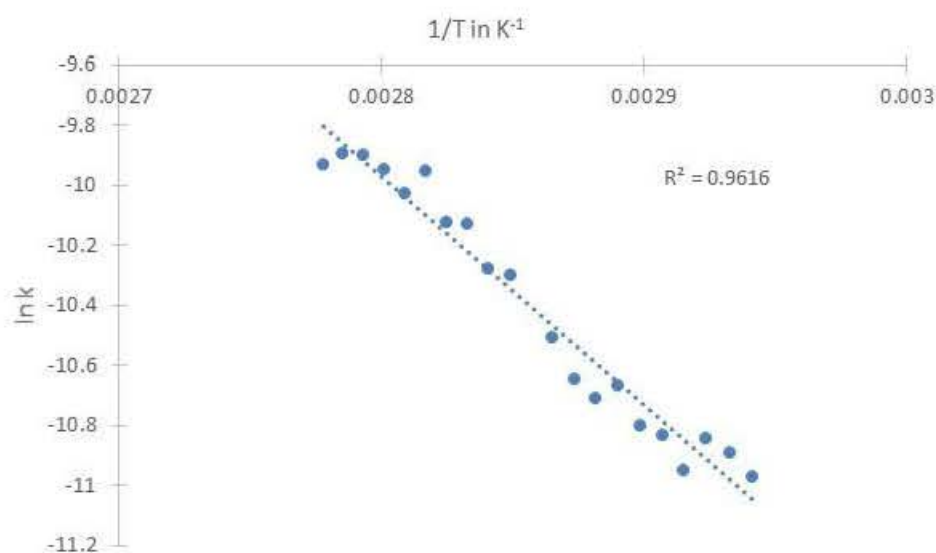


Figure 4: Determination of activation energy according to Arrhenius equation between 67 and 87°C for degradation of eriodictyol in water by microcalorimetry

3.3. Antioxidant activity

The denaturation under heat treatment of flavonoids can affect their antioxidant activities. Thus, the evolution of this activity was assessed before and after heat treatment. The antioxidant activity of each flavonoid was measured using the ABTS assay. The antioxidant activity of flavonoids before heat treatment (control) were equal to 2.66 ± 0.34 mmol/l for rutin, 1.34 ± 0.04 mmol/l for mesquitol, 1.26 ± 0.09 mmol/l for eriodictyol and 0.30 ± 0.09 mmol/l for

naringin. These values are in accordance with the results obtained by [10]. The highest antioxidant activity was reached with molecules having an enone structure or a catechol structure. These two elements are missing in the naringin structure (figure 1) which explains its low antioxidant activity. Only rutin possesses an enone structure combined with a carbonyl group in position 4, which gives this flavonoid the highest antioxidant activity among the four flavonoids studied. The antioxidant activities after heat treatment are shown in figure 5.

These profiles are expressed as a percentage of the measured activities compared to initial antioxidant activity. This allows a distinction between antioxidant activity due to the residual flavonoid (represented in light grey) and antioxidant activity due to the by-products of the degradation (represented in dark grey).

The results obtained indicate that despite its low degradation, the heated solution of naringin, exhibits a high antioxidant activity with an increase of up to 140 % at the temperature of 130°C. No significant differences in the antioxidant activities were observed between samples in water or in propylene glycol (10%).

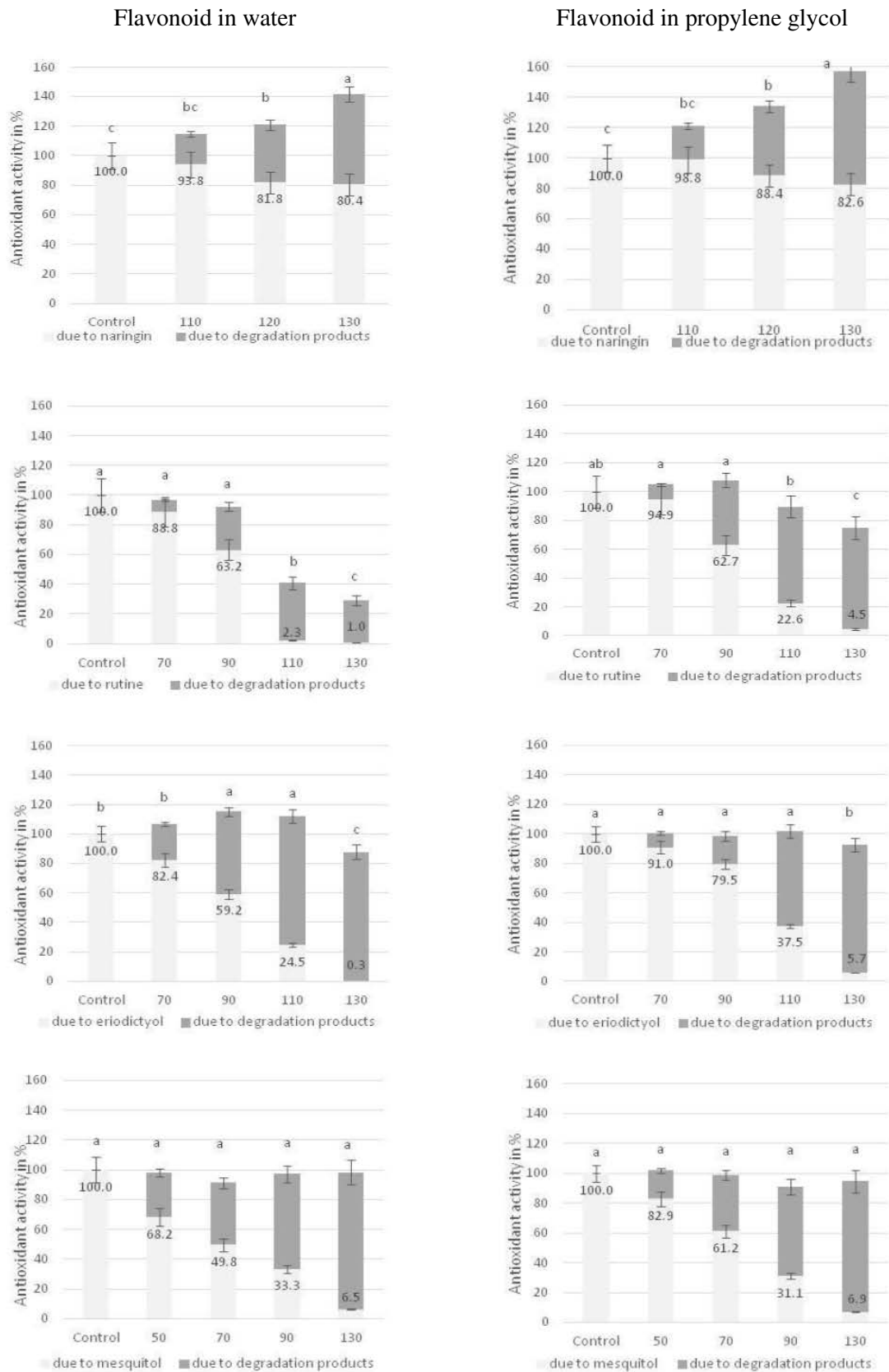


Figure 5: Evolution of the antioxidant activity of flavonoids after thermal treatment. Residual concentration of flavonoid is indicated on the charts

For eriodictyol in water, a significant increase of antioxidant activity was observed at a temperature of 90°C. This increase could be attributed to the antioxidant activities of by-products (dark grey in figure 5). However, at a temperature of 130°C, this antioxidant activity decreases. This could be explained by the fact that the degradation is sequential leading to end by-products with low antioxidant activities. For this compound, the addition of propylene glycol (10%) allows a constant antioxidant activity to be maintained during the heat treatment except at 130°C where it decreases slightly. This behavior can be attributed to the protective effect of the propylene glycol. For mesquitol, no significant differences appear in antioxidant activity between the control and after a thermal treatment whatever the temperature applied and whatever the solvent used. The degraded products generated from mesquitol seemed to have an antioxidant activity similar to the native flavonoid.

For rutin, the antioxidant activity remains constant up to a heat treatment of 90°C. Then, it decreases at higher temperature (110 and 130°C). However, the decrease is lower in propylene glycol than in water. This behavior can be explained by the fact that the products of the degradation have an antioxidant activity comparable to rutin for a temperature below 90 °C. The decrease of the activities could be attributed to further degradation of the intermediary by-products. The difference of the antioxidant activity between samples in water and in propylene glycol can be due, as explained previously, to the protective effect of the propylene glycol.

3.4. Comparison of the two approaches

The comparison of the results obtained does not indicate any difference in sensitivity between flavonoids in relation to the mode of heat treatment. Both methods lead to similar classification from the most sensitive to the least sensitive flavonoid: mesquitol, eriodictyol, rutin and naringin. This classification is mainly related to the structure of the flavonoids. Glycosylated flavonoids are the least sensitive as observed for rutin and naringin. These results are in accordance with literature data [5] and [11]. Aglycon flavonoids such as mesquitol and

eriodictyol are more sensitive to heat treatment than glycosylated ones. However, a difference in sensitivity was also noticed within the two groups. Among the glycosylated flavonoids, rutin is more sensitive to heat than naringin. As was explained before, this difference is due to the different degree of hydroxylation between the two compounds. Among the aglycon form the sensitivity to heat is variable, depending on the absence or presence of a carbonyl group on C4. The presence of propylene glycol does not affect the sensitivity of flavonoids but allows the delay of the effect of heat treatment. This protective effect is certainly due to an increase of non-covalent bonds in solution which gives more stability to flavonoids. However, for a given compound, the activation energy remains constant whatever the solvent used because as mentioned previously, the presence of propylene glycol creates non-covalent bonds which does not affect the activation energy.

The comparison of the activation energies under isothermal and under non isothermal conditions shows significant differences for rutin and mesquitol. In the case of eriodictyol, the activation energies are of the same order of magnitude. For rutin, a decrease of the activation energy under non isothermal conditions from 78 ± 2 to 61 ± 5 kJ/mol was observed, whereas for the mesquitol an increase from 33 ± 2 to 58 ± 3 kJ/mol was noticed.

Similar behavior was observed during heat treatment of anthocyanin [12], [13] and [14]. These authors showed that the energy of activation increases with temperature. This could be due to the coexistence in solution of several chemical species: the native flavonoids and their by-products. Brouillard et al. [15] reported that the modification of the composition of the medium affects the energy of activation.

The variation in the composition of the studied solution leads also to a variation of kinetic parameters between isothermal and non-isothermal treatments. These differences can be attributed to the difference in the mode of treatment. In fact, in isothermal mode the set point desired between 30 and 130 °C was reached quickly and then the temperature was kept constant

for two hours, whereas in non-isothermal treatment the temperature rose from 30 to 130 with an increment of 4° per hour, which corresponds to equivalent exposure of 24 h to 78°C. During this long time, different linkage can take place between the solvent and the flavonoids affecting the kinetic parameters. In fact, Dall'acqua et al. [16] showed that during the storage of flavonoids, different reactions between the solvent and the flavonoids can occur particularly for flavonoids with a hydroxyl in position 3.

4. Conclusion

To study the thermal stability of four flavonoids (naringin, eriodictyol, mesquitol and rutin) with different structures, flavonoid solutions were heated under isothermal and non-isothermal conditions. The results obtained showed that the flavonoid degradation depends on the heating temperature and on the structure of the molecule. Degradation constant rates of flavonoids increase with temperature. Naringin is the least sensitive flavonoid followed by rutin, eriodictyol and mesquitol whatever the heating conditions. The activation energies vary according to the mode of heating (isothermal or non-isothermal conditions). Activation energy increases for mesquitol, decreases for rutin and remains constant for eriodictyol. The addition of propylene glycol in solution enhances the solubility of the flavonoid and ensures a protective effect for the flavonoid against the heat treatment. Despite the degradation of flavonoids, the antioxidant activity is not lost. It seems that the degraded products could have an antioxidant activity equal or sometimes superior to native flavonoids.

REFERENCES

- [1] Tomás-Barberán FA, Ferreres F, Gil MI. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing In: Atta-ur-Rahman (Eds.). Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier Science; 2000. p.739-795.
- [2] Ioannou I, Hafsa I, Ghoul M. Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behavior. J Food Eng 2012;111:208-217.
- [3] MAKRIS DP, ROSSITER JT. Heat-induced, Metal-Catalyzed Oxidative Degradation of Quercetin and Rutin (Quercetin 3-O-Rhamnosylglucoside) in Aqueous Model. Agricultural Food Chem 2000;48:3830-3838.

- [4] Da Costa EM, Barbosa Filho JM, Do Nascimento TG, Macedo RO. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. *Thermochim Acta*; 2002;392-393:79-84.
- [5] Buchner N, Krumbein A, Rhon S, Kroh LW. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Commun Mass Sp* 2006;20:3229-3235.
- [6] MURAKAMI M, YAMAGUCHI T, TAKAMURA H, MATOBA T. Effects of Thermal Treatment on Radical-scavenging Activity of Single and Mixed Polyphenolic Compounds. *Food Chemistry and Toxicology* 2004;69:FCT7-FCT10.
- [7] Ungar Y, Osundahunsi OF, Shimoni Y. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. *J Agr Food Chem* 2003;51:4394-4399.
- [8] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med* 1999;26(9-10):1231-1237.
- [9] Smith GJ., Thomsen SJ, Markham KR, Andary C, Cardon D. The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *J Photoch Photobio A* 2000;136:87-91.
- [10] Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13:572-584.
- [11] Rohn S, Buchner N, Driemel G, Rauser M, Kroh LW. Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *J Agr Food Chem* 2007;55:1568-1573.
- [12] KIRCA A, CEMEROGLU B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chem* 2003;81(4):583-587.
- [13] HARBOURNE N, JACQUIER JC, MORGAN DJ, LYNG JG. Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. *Food Chem* 2008;111(1):204-208.
- [14] JIMÉNEZ N, BOHUON P, LIMA J, DORNIER M, VAILLANT F, PÉREZ AM. Kinetics of anthocyanin degradation and browning in reconstituted blackberry juice treated at high temperatures (100-180°C). *J Agr Food Chem* 2010;58(4):2314-2322.
- [15] Brouillard R. Chemical structure of anthocyanins. In P. Markakis (Ed.). *Anthocyanins as food colours*. New York: Academic Press; 1982. p.1-40.

I.2.2. Contribution de l'article

Les résultats obtenus par un procédé thermique réalisé dans des conditions non isothermes sont identiques à ceux obtenus dans des conditions isothermes. En effet, les flavonoïdes du plus sensible au moins sensible sont le mesquitol, l'ériodictyol, la rutine puis la naringine. Cette différence de sensibilité s'explique principalement par des éléments liés à la structure des flavonoïdes. Les mêmes conclusions que dans le I.1.2. sont retrouvées. La glycosylation, le degré d'hydroxylation et la présence du groupe carbonyle sont des critères jouant sur la sensibilité des flavonoïdes.

La présence de propylène glycol permet de retarder la dégradation des flavonoïdes. Cet effet protecteur est certainement dû à une augmentation des liaisons non covalentes (Van der Waals, des liaisons hydrogène) en solution qui donne plus de stabilité aux flavonoïdes. Les énergies d'activation calculées sont identiques que les flavonoïdes soient dans l'eau ou dans un mélange eau/propylène glycol. Ceci s'explique par le fait que la présence de propylène glycol n'affecte pas le besoin en énergie pour la dégradation des flavonoïdes.

La comparaison des énergies d'activation dans des conditions isothermes et non isothermes a montré des différences significatives pour la rutine et le mesquitol. Pour la rutine, une énergie d'activation plus faible est observée dans des conditions non isothermes 61 ± 5 au lieu de 78 ± 2 kJ/mol. Pour le mesquitol une énergie d'activation plus élevée est calculée dans des conditions non isothermes 58 ± 3 au lieu de 33 ± 2 kJ/mol.

Chapitre II

Effet de l'environnement physico-chimique

II. Effet de l'environnement physico-chimique sur le devenir des flavonoïdes et l'évolution de leur activité anti-oxydante

II.1. Introduction

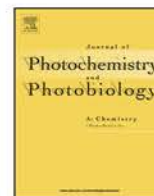
Les flavonoïdes sont des molécules sensibles à leur environnement (**Bergquist, 2007**). Il a été montré que les flavonoïdes ne sont pas stables dans le temps (**Paniwnyk et al., 2001**). De plus, une exposition à la lumière déclenche engendre une photodégradation des flavonoïdes dans des produits alimentaires transformés.. Ainsi, il est important d'étudier les relations entre l'environnement physico-chimique du flavonoïde, son devenir et l'évolution de son activité anti-oxydante. De nombreuses études ont porté sur l'effet de la lumière et/ou de l'oxygène sur la dégradation des flavonoïdes mais les flavonoïdes étant dans des matrices alimentaires, peu ont établi la relation entre l'environnement physico-chimique des flavonoïdes, leur stabilité, leur activité anti-oxydante et leur structure.

Dans cet article, l'effet de la lumière et de l'oxygène a été étudié sur le devenir de 6 flavonoïdes de structure différente. Les flavonoïdes utilisés sont la rutine, la naringine, l'ériodictyol, le mesquitol, la lutéoline et la lutéoline 7-O glucoside. Les cinétiques de dégradation des 6 flavonoïdes ainsi que l'évolution de leur activité anti-oxydante ont été tracées. Les produits d'oxydation de la rutine et de l'eriodictyol ont été déterminés. Les résultats de cette partie ont fait l'objet d'une publication intitulée « **The photostability of flavanones, flavonols and flavones and evolution of their antioxidant activity** ». Cet article a été accepté dans la revue *Journal of Photochemistry and Photobiology*.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotochem

Invited feature article

The photostability of flavanones, flavonols and flavones and evolution of their antioxidant activity

Hind Chaaban^a, Irina Ioannou^{a,*}, Cedric Paris^b, Céline Charbonnel^a, Mohamed Ghoul^a^a Lorraine University, Laboratory Reactions and Process Engineering (LRGP), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602 54518 Vandoeuvre Cedex, France^b Lorraine University, Laboratory of Biomolecules Engineering (LBio), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602 54518 Vandoeuvre Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 June 2016

Received in revised form 24 December 2016

Accepted 27 December 2016

Available online 3 January 2017

Keywords:

Photostability

Oxidation

Flavonoid

Antioxidant activity

ABSTRACT

The objective of this paper is to study the effect the light on the stability of 6 flavonoids with different structures under different oxygen amounts. The evolution of their antioxidant activity and the identification of degradation products were also investigated. The results obtained indicated that the kinetics of flavonoid degradation are not only influenced by the light intensity and the oxygen amount but also by the flavonoid structure. The 6 flavonoids can be ranked below according to their stability: naringin, eriodictyol then rutin, luteolin, luteolin-7-O-glucoside and mesquitol. The presence of a hydroxyl group in position 3 and a double bond C2-C3 decrease flavonoid stability. Moreover, it was also observed that despite the total degradation of some flavonoids, the treated solutions still have an antioxidant activity. The identification of the degraded products by LC-MS showed that the degradation pathways are different according to the flavonoid studied.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Recent epidemiological studies showed that a diet of fruit and vegetables rich in phenolic compounds leads to a general well-being of consumers. This observation is attributed to the antioxidant activity of phenol which favors the reduction of specific diseases such as diabetes, cancer, cardiovascular or neuronal diseases [1]. Among phenolic compounds, flavonoids are the most studied class. These studies indicated that the antioxidant activity of flavonoids depends on their structure [2,3]. Thus, any modification of their structure such as alkylation or glycosylation leads to an increase or a decrease of their antioxidant activity. The physico-chemical environmental of their storage such as light, oxygen, pH, temperature and darkness also provokes significant variations of their antioxidant activity. Landete [4] reported severe degradations successively due to oxygen and light. Thus, flavonoids exposed to light or oxygen undergo degradations of their structure, which can alter their activities. Ioannou et al. [5] reviewed the effect of light on flavonoid content and conclude that flavonoids in raw food are stable to light because they are protected

by the food matrix, [6,7] whereas flavonoids in processed food undergo photo degradation. [8] The effect of light and oxygen on antioxidant activity has scarcely been discussed; only Aramwit et al. [9] mentioned a significant decrease of anthocyanin content and antioxidant properties of mulberry fruit extracts after their exposure to normal fluorescent light for 10 h. Moreover, most studies on the flavonoid stability under light deal with flavonoids in raw food. Thus, the conclusions drawn vary according to the food matrix and the lighting conditions (intensity, visible light or UV). In this paper, the effect of light on the stability of 6 flavonoids (rutin, mesquitol, naringin, eriodictyol, luteolin and luteolin-7-O-glucoside), and the evolution of their antioxidant activity will be thoroughly investigated under different operating conditions (with/without light, at two oxygen amounts). Model solutions of these compounds were exposed to darkness and light for two weeks at two oxygen amounts. The kinetics of their degradation and the evolution of their antioxidant activity were established and compared. Moreover, both the behavior of these kinetics and antioxidant activity were discussed taking the different flavonoid structures into account.

* Corresponding author.

E-mail addresses: hind.chaaban@univ-lorraine.fr (H. Chaaban),
irina.ioannou@univ-lorraine.fr (I. Ioannou), cedric.paris@univ-lorraine.fr (C. Paris),
celine.charbonnel@univ-lorraine.fr (C. Charbonnel),
mohamed.ghoul@univ-lorraine.fr (M. Ghoul).

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Naringin, rutin, 2'-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (Lyon, France). Eriodictyol, luteolin, luteolin-7-O-glucoside were purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Mesquitol was extracted from a Kenya tree *proposis juliflora*. Structural elucidation was based on FTIR, 1H and 13C NMR, GC-MS and HPLC analyses. Results obtained showed the obtaining of (–) mesquitol as a sole compound with a high purity [10]. Trolox and potassium persulfate were purchased from Fluka-Sigma-Aldrich. Methanol and ethanol were respectively from Carlo Erba (Marseille, France) and VWR (Paris, France). All reagents and solvents were of analytical grade.

2.2. Structural differences between flavonoids

The flavonoids chosen for this study are characterized by a difference in their structure (Fig. 1) and have a good solubility in water. The flavonoids are subdivided into nine classes. All compounds of the same class have a common structure; four classes are relevant to study because their common structure differs from each other by one structural element (Table 1). To study the effect of light and oxygen, six molecules belonging to these four classes of flavonoids were selected.

Flavones (luteolin, luteolin-7-O-glucoside) differ from flavonols (rutin, quercetin) by the absence of the catechol structure. Flavanones (naringin, eriodictyol) differ from flavonols (rutin, quercetin) by the absence of the enone structure on the ring C. Flavanols (mesquitol) differ from flavonols (rutin, quercetin) by the absence of the enone structure and a carbonyl group on the ring C.

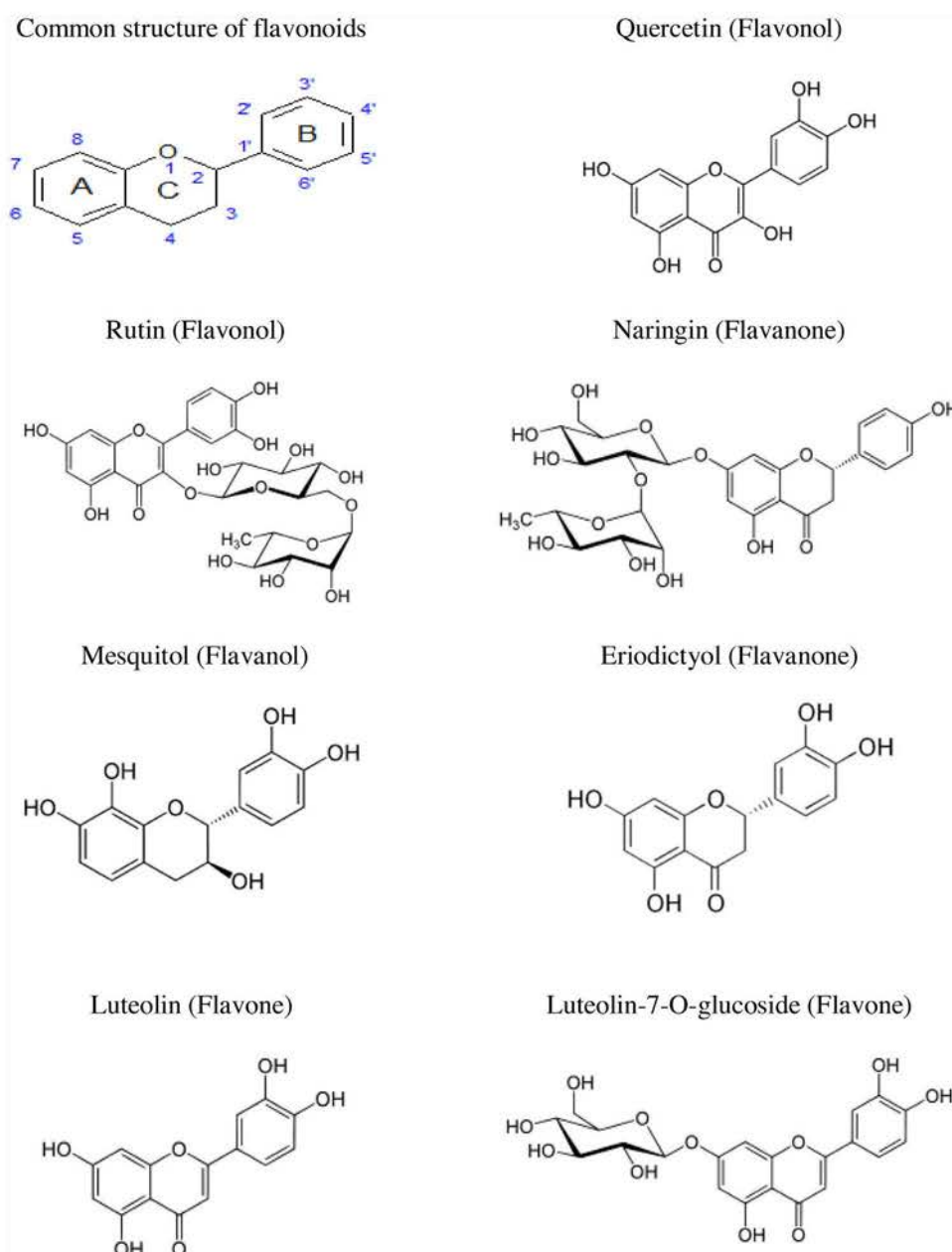


Fig. 1. Chemical structure of the flavonoids studied.

Table 1
Differences between the structures of the flavonoids studied.

	Quercetin	Rutin	Naringin	Luteolin-7-O-glucoside	Luteolin	Eriodictyol	Mesquitol
Class	Flavonol	Flavonol	Flavanone	Flavone	Flavone	Flavanone	Flavanol
Glycosylation	No	Glucose-Rhamnose in position 3.	Glucose-Rhamnose in position 7.	Glucose in position 7.	No	No	No
Enone structure	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No
OH groups	5	4	2	3	4	4	5
OH position	3'-4'-3-5-7	4'-5'-5-7	4'-5	3'-4'-5	3'-4'-5-7	3'-4'-5-7	3'-4'-3-7-8

Thus, the aim is to compare stability to light of the different classes of flavonoids and to understand how structure can affect flavonoid sensitivity. In this study, water was chosen as food matrix.

2.3. Model solutions

Aqueous solutions of six flavonoids were prepared according to their solubility limit (naringin 0.29 mM, rutin 0.041 mM, mesquitol 0.93 mM, eriodictyol 0.059 mM, luteolin 0.0087 mM, luteolin-7-O-glucoside 0.014 mM). Flavonoids were solubilized in the dark at 25 °C under an air atmosphere, until the maximum solubilization was achieved.

2.4. Exposure to light of model solutions

A climatic cell (Climacell, Thermofisher) was used to mimic the visible light during the study (Fig. 2). The different model solutions were filtered through a syringe filter (0.20 μm) then 10-mL samples of each solution were put in screw-cap pyrex tubes. Two sets were prepared, one with nitrogen bubbling of 2 min which leads to an oxygen amount of 15% and the other one without bubbling, with an oxygen amount of 85%. Oxygen concentrations are respectively 0.03 mM for 15% oxygen solutions and 0.19 mM for the 85% oxygen solutions.

Climatic cell is set at 25 °C. Model solutions were exposed to 0% light (darkness) and 100% light. An intensity of 100% is equivalent to an exposure at 16.5 klux. Each day one sample per set is removed for 15 days.

The residual flavonoid content and the antioxidant activity of the solution were measured.

2.5. Liquid chromatography with diode array detection analysis

Flavonoid contents were analyzed in an Elite Lachrom HPLC system (VWR, Dietikon, Switzerland) which consisted in a quaternary pump (L-2130), an autosampler (L-2200) and a diode-array detector (L-2455). The analyses were carried out on a C18 (150 × 4.6 mm) column (Grace/Alltech, Darmstadt, Germany). The different compounds were separated using a water (A) + methanol (B) elution system. Samples were eluted at a flow rate of 1 mL/min by a gradient of: 95% water (A) at time 0 up to 100% (B) at 10 min and finally 95% (A) at 20 min before the end of the program. The total duration is 30 min. The injection volume was of 50 μL and the column temperature was set at 50 °C. The detection was performed simultaneously at 200, 280, 254 and 350 nm. Flavonoid content was expressed as a percentage compared to the initial content. Then, the degradation kinetic was plotted according to exposure time. Triplicate measurements were taken for all samples.

2.6. Identification of the new formed products from flavonoid degradation

Solutions of flavonoids were prepared in 100 mM KCl and 0.36 mM KOH in order to increase solubility; respective concentrations were 1 mM for quercetin, 0.5 mM for rutin and 0.5 mM for eriodictyol [11]. These solutions undergone bubbling with oxygen until a sufficient degradation, two hours for quercetin and 26 h for rutin and eriodictyol.

Degradation products obtained by oxidation in 100% water are the same than those obtained in 100 mM KCl and 0.36 mM KOH. The profiles obtained by HPLC showed the same peaks with the same retention time. Qualitative and semi-quantitative analysis of new formed products were realized on a HPLC-MS system (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting in a binary solvent delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ mass spectrometer equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in electrospray negative mode (ESI⁻). 25 μL of flavonoid oxidized solutions were separated on a C18 Alltima (150 mm × 2.1 mm) column (Grace/Alltech). The flow rate was set at 200 μL/min and mobile phases consisted in water modified with trifluoroacetic acid (0.1%) for A and acetonitrile modified with trifluoroacetic acid (0.1%) for B. Oxidation products were eluted using a first isocratic step at 15% of B during three min and then a linear gradient from 15% to 90% of B for 27 min. Mass spectrometric conditions were as follows for ESI⁻ mode: spray voltage was set at 5 kV; source gases were set (in arbitrary units min⁻¹) for sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at 40, 10 and 10, respectively; capillary temperature was set at 300 °C; capillary voltage at -36V; tube lens, split lens and front lens voltages respectively at -80V, 44V and 3.25V.

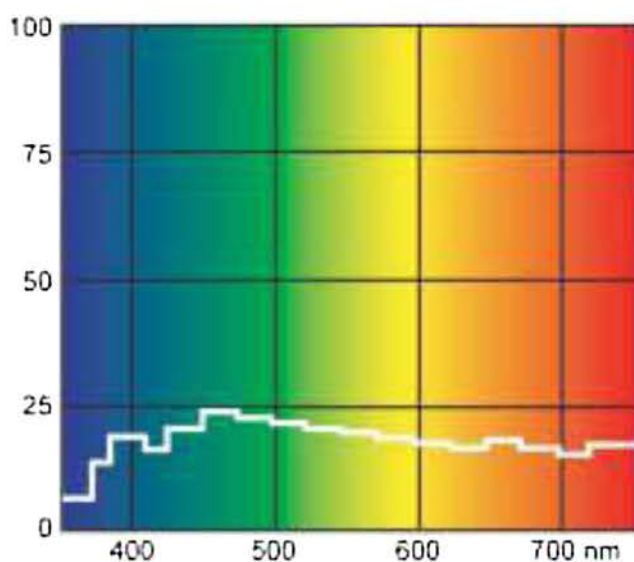


Fig. 2. Wavelengths corresponding to lighting used in Climacell.

2.7. Antioxidant assay (ABTS)

The antioxidant activity was determined every 15 min during the thermal treatment by the trolox equivalent antioxidant capacity method. ABTS assays were performed with a spectrofluorimeter SAFAS Xenius (SAFAS, Monaco) equipped with a 96-well polystyrene plate. Scavenging free radical potentials were tested in an aqueous solution of ABTS according to the method described by Re et al. [12] with modification for use in microplates. The percentage of inhibition was calculated by the equation: $(IP\%) = \frac{A_C - A_S}{A_C} \times 100$ where A_C and A_S are respectively the absorbance of the control and of the test sample.

Results were expressed as millimoles of TEAC values (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). From this measurement, we determine Δ TEAC. It corresponds to the difference between the total TEAC of the solution and the TEAC due to the residual flavonoid in solution. According to the evolution of Δ TEAC, three cases can be observed: (i) an increase of Δ TEAC then the products formed have an antioxidant activity that is higher than the native flavonoid; (ii) a decrease of Δ TEAC indicates less antioxidant activity of the degradation products and (iii) a Δ TEAC constant means that degradation products have the same antioxidant activity as the native flavonoid. Triplicate measurements were taken for all samples.

2.8. Statistical analysis

Experiments were performed using three replicates. Statistical analysis was performed by using the freeware R (2.11.1). In all the tests, criteria for statistical significance was $p < 0.05$. Measurement repeatability was assessed around 5% of the residual concentration.

3. Results and discussion

The stability and the antioxidant activity of the six flavonoids studied were investigated under low and high oxygen content, with or without light.

3.1. Degradation behavior of flavonoids under different oxygen and light intensity

The stability of flavonoids during their storage can be affected either by light or by oxygen. Moreover, these two factors can have a synergic effect. To elucidate the role played by each factor, the residual concentrations of flavonoids were evaluated under different operating conditions (light/dark with two oxygen amounts) over 240 h. The results obtained are summarized in Fig. 3.

The six flavonoids studied can be ranked depending on their stability into three groups. Naringin and eriodictyol (group 1) exhibit the highest stability followed by luteolin-7-*O*-glucoside, rutin, luteolin (group 2) and mesquitol (group 3). Whatever the amount of oxygen in the medium, the mesquitol is completely depleted from the medium after 20 h in presence of light. For the most resistant flavonoids (naringin and eriodictyol) even with a 250 h storage, the residual concentrations remain above 78% except for eriodictyol. For the latter, the degradation reaches 40% with light and a high oxygen content after 150 h of incubation. For rutin, the concentrations remain almost unchanged during the first 48 h and then followed by a rapid drop until 240 h in darkness conditions. In a lighted environment, the degradation starts early and continues even after 240 h. The luteolin-7-*O*-glucoside presents an intermediate behavior and the effect of light is not amplified in the presence of a high level of oxygen.

The appearance of the degradation kinetics indicates that the stability of flavonoids varies from one molecule to another. Indeed,

flavonoid degradation may begin immediately or be delayed for a longer or shorter period depending on the molecule structure and operating conditions (light, oxygen amount). This is what can be observed for rutin, naringin in darkness environment and for eriodictyol (light with high oxygen amount). For the others molecules, the kinetics of degradation whatever the oxygen content are characterized by a decrease followed by a stabilization. The decrease can be rapid like for the naringin in lightening conditions or slower like luteolin, mesquitol or rutin. This kind of profile was already found during photodegradation of 3-hydroxyflavone [13]. These different profiles can be explained by thermodynamic equilibrium between the substrates and the formed products. The level of the equilibrium depends on the nature and the concentration of the initial substrate, the nature and the concentration of the formed products and the operating conditions. This behavior, can also be attributed to the fact that for some reactions it was observed that the formed products are also degraded, which accentuates the shift before reaching again the equilibrium.

These results indicate clearly that flavonoids are not stable over time even in a dark medium and at a low oxygen content. Furthermore, for naringin, rutin, eriodictyol and mesquitol whose concentrations are upper than oxygen concentration in solution (see Section 2.4), the flavonoid sensitivity to oxygen is low in comparison with their sensitivity to light. Thus, we can conclude that the amount of oxygen plays only a minor role compared to the effect of light on flavonoid degradation. Similar findings were reported by Morais et al. [14] for anthocyanins in aqueous solutions. Dall'Acqua et al. [15] attributed the degradation of flavonoids to two reactions. The first reaction consists of an addition of the solvent to the molecule on the enone structure and the second one is an oxidation reaction on the hydroxyl group in position 3. Thus, flavonoids would be more sensitive with an enone structure and a hydroxyl in position 3. This assumption is confirmed by the results obtained in this work. In fact, flavanones (naringin and eriodictyol), where enone structure and hydroxyl in position 3 are missing, appeared the most stable among the six flavonoids studied. Luteolin, luteolin-7-*O*-glucoside and rutin with an enone structure but without the hydroxyl group in position 3 remain stable for at least 2 or 3 days while mesquitol with only a hydroxyl group in position 3 exhibits a high sensitivity. Similar results were found by Zhang et al. [16] which showed that the glycosylation of an OH group in position 3 gives more stability to the flavonoid in a light exposure.

These results show also that the stability of a given flavonoid is more influenced by the hydroxyl group in position 3 than the enone structure. This conclusion is in accordance with the findings of Smith et al. [17] during their study on the photostability of different flavonoids. These authors underlined that the presence of a 3-OH group is the determinant factor in flavonoid photo-reactivity. In this work, the effect of oxygen is observed only for mesquitol. Contradictory results were found in literature; several authors indicated that flavonoids are sensitive to oxygen with many degradation products [11,18]. However, Tournaire et al. [19] underlined that flavonoid reactivity to oxygen depends on the ring C of flavonoid structure. They determined that flavanones and flavanes are chemically stable in the presence of oxygen while flavones and flavonols are more sensitive. However, oxygen degradation rate is highly decreases when the hydroxyl group in position 3 is missing. These findings are in accordance to our results and explain the sensitivity of mesquitol in the presence of oxygen, indeed it is the only compound among the 6 studied which have a 3 hydroxyl group. This can be explained by the fact that the hydroxyl group in position 3 activates the C2-C3 double bond in presence of oxygen which leads to an opening of the ring C of flavonoid structure [11].

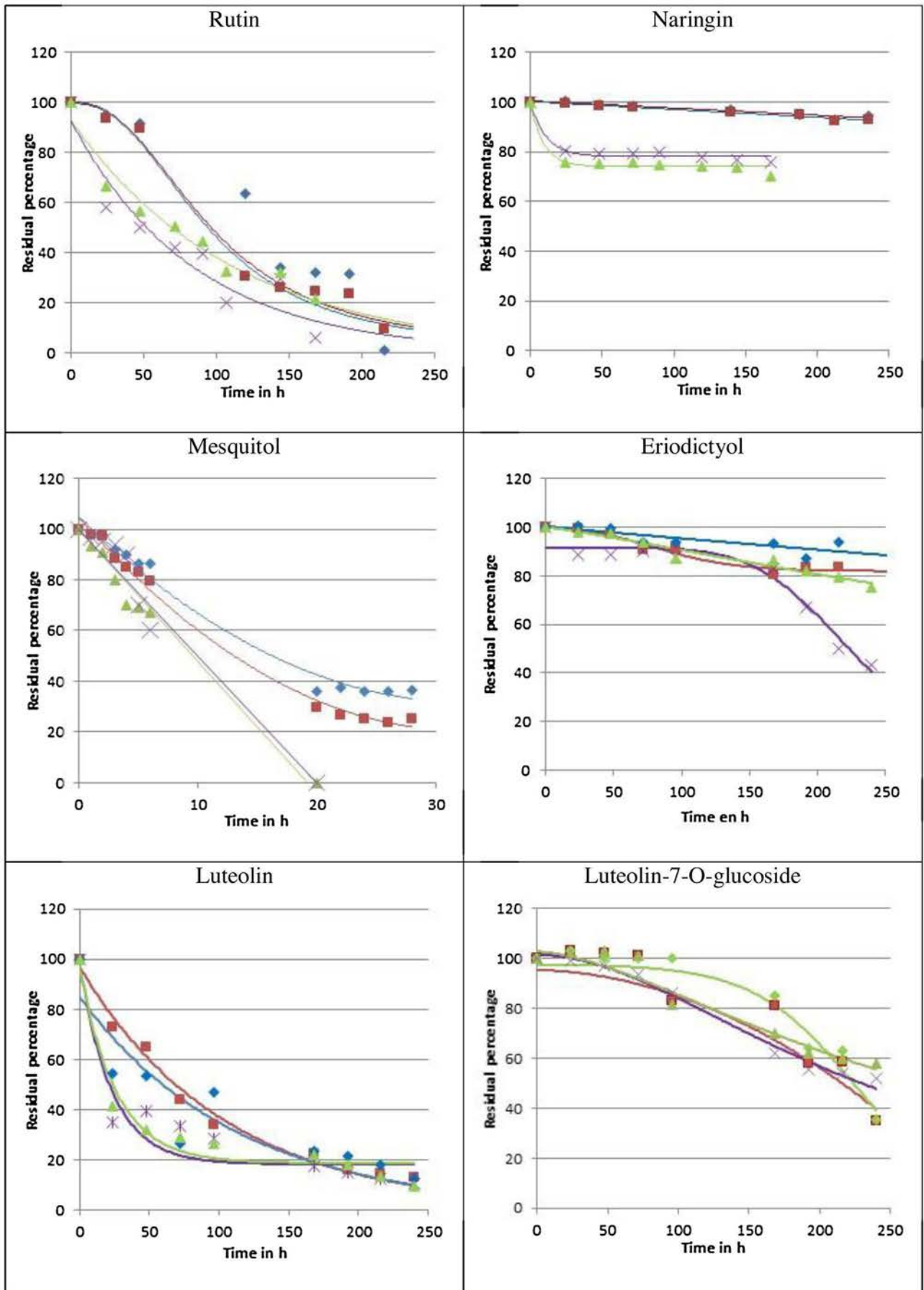


Fig. 3. Degradation kinetics of 6 flavonoids under different conditions: ×light (+O₂) Δ light (-O₂) ■dark (+O₂) ◆ dark (-O₂).

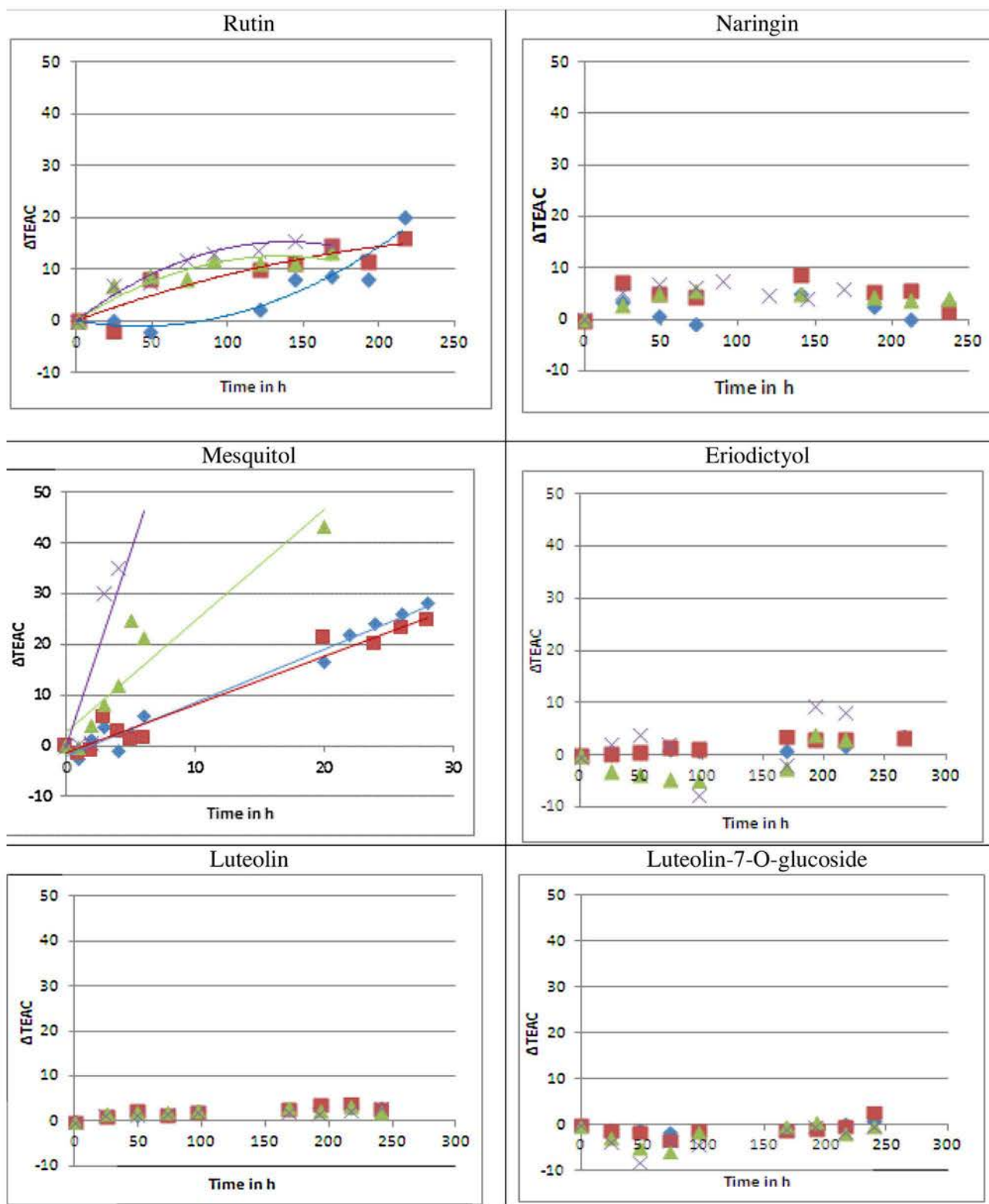


Fig. 4. Evolution of ΔTEAC under different conditions of light and oxygen \times light (+O₂) Δ light (-O₂) \blacksquare dark (+O₂) \blacklozenge dark (-O₂).

3.2. Evolution of antioxidant activity

Besides the stability evolution during storage, antioxidant activity can also be affected by the light and the oxygen. To demonstrate this effect, the antioxidant activities were investigated and the ΔTEAC variations obtained over time are summarized in Fig. 4.

The statistical analysis realized on three replicates indicates that the standard deviation on ΔTEAC is equal to 5. So only ΔTEAC higher than 5 are considered as significant. Taking this fact into account, it appears that only the antioxidant activity of rutin and mesquitol are affected by the tested operating conditions. This effect induces an increase of ΔTEAC . This means that the neofomed products from rutin and mesquitol degradation have

an antioxidant activity higher than these native molecules. For luteolin and luteolin-7-O-glucoside, Δ TEAC remains unchanged while for naringin, the non-significance of Δ TEAC is due rather to the high stability of this molecule than to the reactivity or not of the neoformed products. For rutin, in the dark and at a low amount of oxygen the kinetic of degradation presents two shapes: slow during the first 100h of exposure and then an increase for the remaining time. For the three other conditions, the profiles of Δ TEAC are rather similar.

For mesquitol, both light and oxygen have a significant effect on the magnitude of Δ TEAC. The most rapid increase is observed in presence of light and with the high amount of oxygen. It is four times as high as in a low level of oxygen with light. These observations could be explained by the existence of different degradation pathways leading to different new formed products [15,20].

3.3. Identification of flavonoid degradation products

To assess that different new formed products are obtained during the flavonoid degradation, three flavonoids rutin (glycosylated), quercetin (aglycon) and eriodictyol (aglycon without the enone structure) were chosen. The quercetin is considered as a reference because it is already studied in the literature and it

constitutes the aglycon part of rutin. The residual content of flavonoids during the oxidation period are given in Annex materials. These results indicated that quercetin is the highly sensitive to oxygen. After 2 h of bubbling, this molecule is almost totally degraded (91%). However, for rutin and eriodictyol, the kinetics of degradation occur with a slow rate; after 26 h, only 18% of rutin and 92% of eriodictyol are lost. To identify the new formed products, samples were taken during time and analyzed by LC–MS.

3.3.1. Identification of new formed products from quercetin oxidation

The results obtained showed that the oxidation of quercetin leads to P1 (2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one) in a first step and then P1 is degraded in a second step to form P2 (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-oxoacetic acid), P3 (2,4,6-trihydroxybenzoic acid), P4 (3,4-dihydroxybenzoic acid), P5 ((3',4',5',6'-tetrahydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one) and P6 ((3',4',5'-trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one).

The molar masses of the new formed products are summarized Table 2 and the degradation pathway is indicated on Fig. 5. The chromatograms obtained by LC–MS are given in Annex materials. Similar pathway of quercetin oxidation is already described by Ramešová et al. [11] except for P5 and P6. P2 and P3 were also identified during photo-oxidation of quercetin by Ferreira et al.

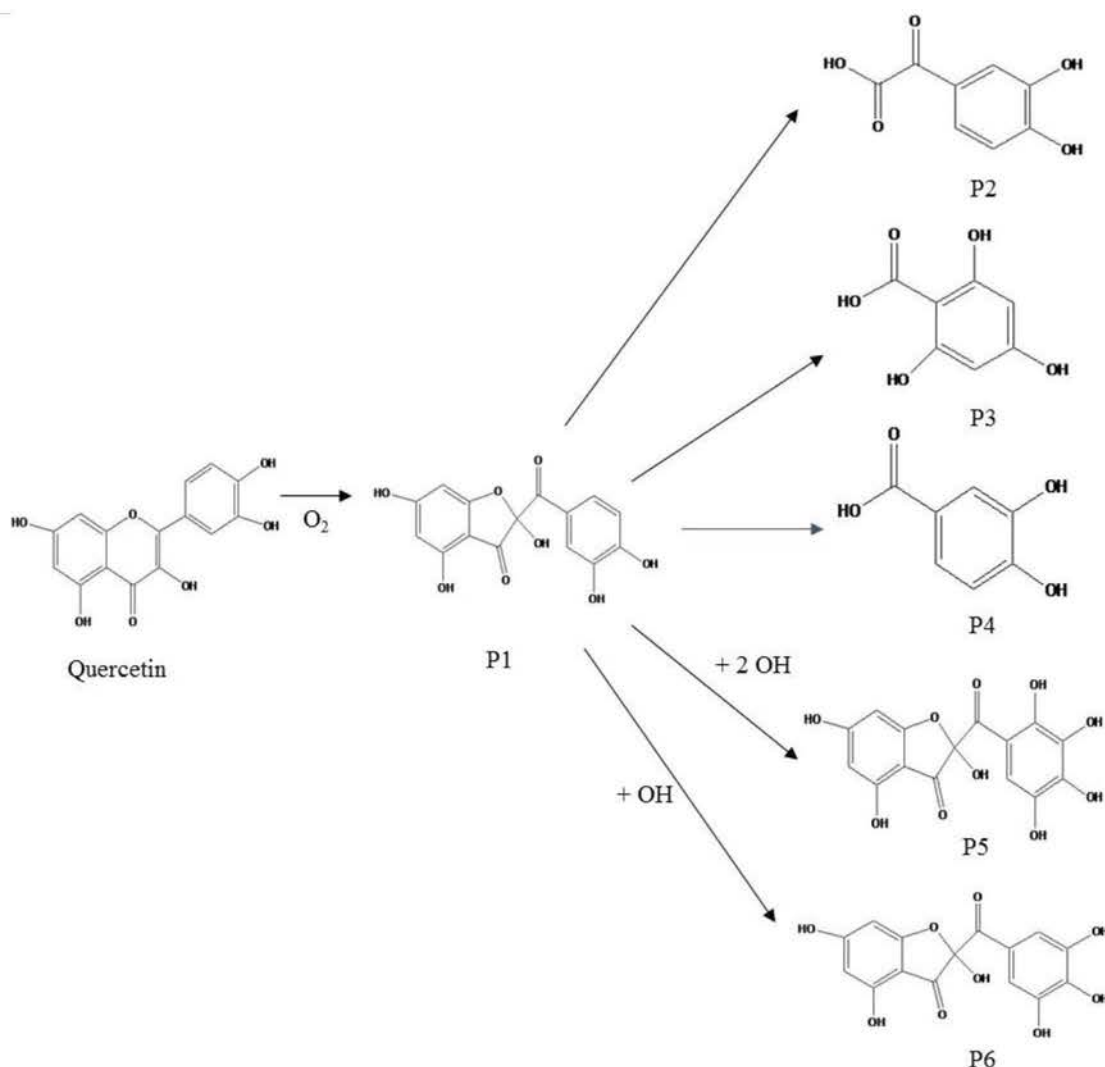


Fig. 5. Degradation pathway of quercetin by oxidation.

Table 2
LC–MS data obtained for the oxidation of quercetin, rutin and eriodictyol.

Peak	Retention time [min]	m/z values [M-H] ⁻	m/z values MS/MS	Suggested compound
Quercetin (1 mM) in 100 mM KCl and 0.36 mM KOH				
P1	9.93	317	191	2-(3',4'-dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one
P2	3.28	181	ND	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-oxoacetic acid
P3	5.46	169	151	2,4,6-trihydroxybenzoic acid
P4	6.47	153	ND	3,4-dihydroxybenzoic acid
P5	11.82	349	330	(3',4',5',6'-tetrahydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one
P6	12.40	333	179	(3',4',5'-trihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxybenzofuran-3(2H)-one
Rutin (0.5 mM) in 100 mM KCl and 0.36 mM KOH				
P1	9.56	1217	ND	Dimers of rutin
P2	10.06			
P3	8.63			
P4	8.77	1825	ND	Trimers of rutin
P5	7.70			
P6	2.97	More than 2000	ND	Polymer of rutin
Eriodictyol (0.5 mM) in 100 mM KCl and 0.36 mM KOH				
P1	12.74	351	289–217–307–245–277–177–125	Unknown
P2	17.84	585	415–459–433–325–567	Unknown
P3	18.82	695	525–543–569–677–407	Unknown
P4	5.91	289	163–177–125–137–195–151–111	Unknown

ND: No data obtained.

[21]. These two by-products are observed only in this work. Similar methodology was applied for the two other flavonoids.

3.3.2. Identification of new formed products from rutin oxidation

As for the quercetin, the oxidation of rutin was assessed by LC–MS (chromatograms presented in annex materials). It appears that after two hours of incubation, only one product was observed. This product is a dimer of rutin. Further exposure to oxidation (26 h) leads to the formation of several products with different molar masses (Table 2) corresponding to three dimers, two trimers and one polymer. It seems that different linkages between monomers can occur (C–C, C–O) and on the different positions of the rutin backbone [22]. These results indicated that the oxidation pathway of quercetin and rutin are not similar in spite of the presence of genin part in the two molecules.

3.3.3. Identification of new formed products from eriodictyol oxidation

The chromatograms of the oxidation of eriodictyol are indicated in annex materials. The molar masses of the different by-products are summarized in Table 2. After three hours incubation, three products (P1, P2 and P3) were observed and at the end of oxidation (26 h), a new product appears (P4). The exact pathway of the degradation of this molecule is not yet established because the structure of these new products are not yet elucidated.

4. Conclusion

Flavonoids are not stable even in the dark with a low quantity of oxygen. Light has an effect on the stability of flavonoids and their biological activities. However, the magnitude of the degradation depends on the structure of the molecules. Flavonoids without an enone structure exhibit the highest stability while those with a hydroxyl group in position 3 are the most sensitive. The degradation of flavonoids leads also to an increase of the antioxidant activity of rutin and mesquitol. This behavior indicates that the antioxidant activity of degradation products is higher compared to native molecules. Synergic effects between neo-formed and native molecules can also be at the origin of this

increase [23,24]. The identification of the by-products degradation showed that different degradation pathways can occur according to the flavonoid structure. Aglycon flavonoids would degrade by breaking some bonds in their structure whereas glycosylated flavonoid as rutin would degrade by polymerization. The degraded products are unstable and some of them exhibit an antioxidant activity higher than the native molecules. The results obtained in this paper indicate that the flavonoid processing needs a drastic control of the chemical environment to avoid their degradation. The effect of the process and the physico-chemical environment is scarcely studied. These results will be taken into account during the flavonoid extraction and their formulation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.12.027>.

References

- [1] F.A. Tomás-Barberán, F. Ferreres, M.I. Gil, Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing, in: Atta-ur Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier Science, 2000, pp. 739–795.
- [2] K.E. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobilya, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 572–584, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5).
- [3] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (7) (1996) 933–956, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9).
- [4] J.M. Landete, Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability metabolism, and health critical, *Rev. Food Sci. Nutr.* 52 (2012) 936–948, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9).
- [5] I. Ioannou, I. Hafsa, M. Ghoul, Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour, *J. Food Eng.* 111 (2012) 208–217, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.006>.
- [6] M.R. Pérez-Gregorio, M.S. Garcia-Falcon, J. Simal-Gandara, Flavonoids changes in fresh-cut onions during storage in different packaging systems, *Food Chem.* 124 (2011) 652–658, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.090>.
- [7] S.Y. Wang, C.T. Chen, Y. Chien, Y. Wang, The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries, *Food Chem.* 112 (2009) 676–684, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.032>.

- [8] M.T. Bordignon-Luiz, C. Gauche, E.F. Gris, L.D. Falcao, Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems, *LWT Food Sci. Technol.* 40 (2007) 594–599, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2006.02.022.
- [9] P. Aramwit, N. Bang, T. Srichana, The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits, *Food Res. Int.* 43 (2010) 1093–1097, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.022.
- [10] P. Sirmah, S. Dumarcay, E. Masson, P. Gerardin, Unusual amount of (–) mesquite from the heartwood of *Prosopis juliflora*, *Nat. Prod. Res.* 23 (2) (2009) 183–189, doi:http://dx.doi.org/10.1080/14786410801940968.
- [11] S. Ramešová, R. Sokolová, I. Degano, J. Bulířková, J. Žabka, M. Gál, On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 975–982, doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5504-3.
- [12] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (9–10) (1999) 1231–1237, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- [13] S. Tommasini, M.L. Calabrò, P. Donato, D. Raneri, G. Guglielmo, P. Ficarra, R. Ficarra, Comparative photodegradation studies on 3-hydroxyflavone: influence of different media, pH and light sources, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 389–397.
- [14] H. Morais, C. Ramos, E. Forgács, T. Cserhádi, J. Oliviera, Influence of storage conditions on the stability of monomeric anthocyanins studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 770 (2002) 297–301, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00055-7.
- [15] S. Dall'Acqua, G. Miolo, G. Innocenti, S. Cafieri, The photodegradation of quercetin: relation to oxidation, *Molecules* 17 (2012) 8898–8907, doi:http://dx.doi.org/10.3390/molecules17088898.
- [16] X. Zhang, D. Cardon, J.L. Cabrera, R.1 Laursen, The role of glycosides in the light-stabilization of 3-hydroxyflavone (flavonol) dyes as revealed by HPLC, *Microchim. Acta* 169 (2010) 327–334, doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00604-010-0361-x.
- [17] G.J. Smith, S.J. Thomsen, K.R. Markham, C. Andary, D. Cardon, The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 136 (2000) 87–91, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1010-6030(00)00320-8.
- [18] I.G. Zenkevich, A.Y. Eshchenko, S.V. Makarova, A.G. Vitenberg, Y.G. Dobryakov, V.A. Utsal, Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature, *Molecules* 12 (2007) 654–672, doi:http://dx.doi.org/10.3390/12030654.
- [19] C. Tournaire, S. Croux, M.-T. Maurette, I. Beck, M. Hocquaux, M. Braun, E. Oliveros, Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen quenching, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 19 (1993) 205–215, doi:http://dx.doi.org/10.1016/1011-1344(93)87086-3.
- [20] S. Ramešová, R. Sokolová, J. Terábek, I. Degano, The oxidation of luteolin, the natural flavonoid dye, *Electrochim. Acta* 110 (2013) 646–654, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.06.136.
- [21] E.S.B. Ferreira, A. Quye, H. McNab, A.N. Hulme, Photo-oxidation products of quercetin and morin as markers for the characterisation of natural yellow dyes in ancient textiles, *Dyes Hist. Archaeol.* 18 (2002) 63–72.
- [22] J. Anthoni, L. Chebil, F. Lionneton, J. Magdalou, C. Humeau, M. Ghoul, Automated analysis of synthesized oligorutin and oligoesculin by laccase, *Can. J. Chem.* 89 (2011) 964–970.
- [23] M. Hidalgo, C. Sánchez-Moreno, S. De Pascual-Teresa, Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity, *Food Chem.* 121 (2010) 691–696, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.029.
- [24] J.D. Reber, D.L. Eggett, T.L. Parker, Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 62 (5) (2011) 445–452, doi:http://dx.doi.org/10.3109/09637486.2010.549115.

II.2. Contribution de l'article

Dans cet article, la sensibilité des flavonoïdes en fonction du temps de stockage, de la présence de lumière ou d'oxygène a été établie. Les flavonoïdes ne sont pas stables dans le temps en l'absence de lumière et d'oxygène. En effet, il se produit une addition du solvant sur les flavonoïdes qui entraînent leur dégradation (**Ramesova et al., 2012**). L'effet de la lumière sur les flavonoïdes est plus marqué que l'effet de l'oxygène. En effet, les vitesses de dégradation les plus élevées sont obtenues sous l'effet de la lumière pour tous les flavonoïdes. Un classement en trois groupes a pu être établi en fonction de leur stabilité durant le stockage. La naringine et l'ériodictyol (groupe 1) présentent la stabilité la plus élevée, suivis par la lutéoline 7-O glucoside, la rutine et la lutéoline (groupe 2) et le mesquitol (groupe 3).

Les éléments clés qui affectent la stabilité des flavonoïdes pendant le stockage sont dans l'ordre d'importance : (i) la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 sur le cycle C et (ii) la présence de la structure énone sur le cycle C. En effet, la naringine et l'ériodictyol dénués de ces éléments sont les flavonoïdes les plus stables alors que le mesquitol sans motif énone et avec un hydroxyle en position 3 est le plus sensible.

La dégradation des flavonoïdes peut conduire à une augmentation de l'activité anti-oxydante (rutine, mesquitol). Ce comportement indique que les produits de dégradation de ces flavonoïdes possèdent une activité anti-oxydante. La détermination des structures des produits d'oxydation de la quercétine et de la rutine et de l'ériodictyol a permis de montrer que les voies de dégradation varient selon la structure de la molécule. En effet les flavonoïdes aglycones (l'ériodictyol et la quercétine), se dégradent par ouverture du cycle C, alors que le flavonoïde glycosylé (la rutine) se polymérise par oxydation.

Conclusion

Nos résultats ont permis de montrer que les procédés thermiques et l'environnement physico-chimique (la lumière, le temps de stockage et l'oxygène) ont un effet sur la stabilité des flavonoïdes et sur l'évolution de leur activité anti-oxydante.

En ce qui concerne l'effet des procédés thermiques, les cinétiques de dégradation des flavonoïdes ont été modélisées selon une cinétique d'ordre 1. La comparaison des constantes de vitesse a permis d'établir que l'intensité de la dégradation des flavonoïdes est proportionnelle à la combinaison temps-température du procédé thermique. De plus, cette intensité dépend aussi de la structure des flavonoïdes. En effet, certains éléments structuraux confèrent plus de stabilité aux flavonoïdes. Ceci se traduit par une énergie d'activation plus élevée lors de la dégradation du flavonoïde. Ces éléments sont la présence d'un substituant glycosyle et un nombre de groupements hydroxyles faible. Ainsi, les flavonoïdes glycosylés avec peu de groupes hydroxyles sont les flavonoïdes les plus stables à la température. Ces conclusions sont vraies pour des procédés thermiques se déroulant dans des conditions isothermes comme dans des conditions non isothermes. L'ajout de propylène glycol aux solutions de flavonoïdes permet de retarder leur dégradation durant un traitement thermique.

En ce qui concerne l'environnement physico-chimique, l'effet de la lumière est prépondérant par rapport à l'effet de l'oxygène. De plus, les flavonoïdes en solution ont montré une instabilité dans le temps. L'intensité de ces dégradations varie en fonction du facteur testé (lumière, oxygène et temps) mais aussi de la de la structure des flavonoïdes. Les éléments structuraux apportant de la stabilité aux flavonoïdes sont l'absence d'un groupe hydroxyle en position 3, l'absence de la structure énone et le nombre de groupes hydroxyles.

L'activité anti-oxydante a été mesurée durant un traitement thermique et avec différents environnement physico-chimique. En dépit de la dégradation importante des flavonoïdes, les solutions conservent une activité anti-oxydante. Celle-ci serait due aux produits de dégradation générés. Les activités anti-oxydantes des solutions après dégradation sont différentes selon les flavonoïdes. Nous n'avons pas pu établir de lien entre la structure du flavonoïde et l'évolution de son activité anti-oxydante. En effet l'évolution de l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la structure du flavonoïde natif mais aussi des voies de dégradation.

Les produits de dégradation de la quercétine, de la rutine et de l'ériodictyol ont été identifiés durant un procédé thermique et durant une oxydation. Ainsi, nous avons pu conclure que les voies de dégradation des flavonoïdes sont multiples et qu'elles dépendent de la structure du flavonoïde. En effet, les flavonoïdes type aglycone se dégradent par ouverture du cycle C, alors que les flavonoïdes glycosylés se polymérisent.

L'ensemble des informations collectées permettra de prédire la stabilité d'un flavonoïde à la température, à la lumière, à l'oxygène ou durant le temps. D'autres informations devraient être ajoutées afin d'affiner notre prédiction. En effet, certains facteurs de dégradation tels que le pH, la pression n'ont pas été étudiés. De même, l'étude de l'effet du solvant ou de la matrice d'incorporation devra être réalisée afin de compléter notre outil de prédiction. Cet outil est pour l'instant qualitatif. Il serait souhaitable de pouvoir quantifier ces relations afin de prédire l'intensité des dégradations (modèles type QSAR). De plus, nous avons pu voir que les produits de dégradation contribuaient à l'activité anti-oxydante des solutions traitées. Il serait intéressant d'étudier les activités biologiques des produits de dégradation identifiées en particulier étudier la toxicité des ces produits. Une collaboration avec le laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Faculté de Monastir, Tunisie a été lancée sur le sujet. Les résultats actuels montrent que la naringine traitée thermiquement améliore l'activité anti-oxydante cellulaire, stimule l'activité cytotoxique des cellules NK chez les souris. Aucune toxicité n'a été rapportée sur les produits de dégradation de la naringine. Il pourrait donc être pertinent de provoquer la dégradation de la naringine pour améliorer ses activités biologiques.

Références

- Alam**, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Aliaga**, C., & Lissi, E. A. (2004). Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin — An experimental and theoretical study. *Canadian Journal of Chemistry*, p. 1668-1673.
- Alighourchi**, H., & Barzegar, M. (2009). Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 179-185. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.019>
- Anthoni**, J., Chebil, L., Lionneton, F., Magdalou, J., Humeau, C., & Ghoul, M. (2011). Automated analysis of synthesized oligorutin and oligoesculin by laccase. *Canadian Journal of Chemistry*, 89(8), 964-970. <https://doi.org/10.1139/v11-072>
- Apak**, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Aramwit**, P., Bang, N., & Srichana, T. (2010). The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. *Food Research International*, 43(4), 1093-1097. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.022>
- Arpino**, P. (1992). Combined liquid chromatography mass spectrometry. Part III. Applications of thermospray. *Mass Spectrometry Reviews*, 11(1), 3-40. <http://doi.org/10.1002/mas.1280110103>
- Asami**, D. K., Hong, Y.-J., Barrett, D. M., & Mitchell, A. E. (2003). Processing-induced changes in total phenolics and procyanidins in clingstone peaches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(1), 56-63. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1275>
- Asongalem**, E. ., Foyet, H. ., Ngogang, J., Folefoc, G. ., Dimo, T., & Kamtchouing, P. (2004). Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(2-3), 301-308. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2004.01.010>
- Aurelio**, D.-L., Edgardo, R. G., & Navarro-Galindo, S. (2007). Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion: Thermal kinetic degradation of anthocyanins. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(2), 322-325. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01439.x>
- Benavente-García**, O., Castillo, J., Del Baño, M. J., & Lorente, J. (2001). Improved Water Solubility of Neohesperidin Dihydrochalcone in Sweetener Blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 189-191. <http://doi.org/10.1021/jf0001861>

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996).** The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of « Antioxidant Power »: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bergquist, S. Å., Gertsson, U. E., Nordmark, L. Y., & Olsson, M. E. (2007).** Effects of shade nettings, sowing time and storage on baby spinach flavonoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(13), 2464-2471. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2956>
- Bernaert, N., De Loose, M., Van Bockstaele, E., & Van Droogenbroeck, B. (2014).** Antioxidant changes during domestic food processing of the white shaft and green leaves of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*): Antioxidant changes during domestic food processing of leek. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1168-1174. <http://doi.org/10.1002/jsfa.6389>
- Betteridge, D. J. (2000).** What is oxidative stress? *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(2 Suppl 1), 3-8.
- Biesaga, M., & Pyrzyńska, K. (2013).** Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chemistry*, 136(1), 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.095>
- Birt, D. F., Hendrich, S., & Wang, W. (2001).** Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90(2-3), 157-177. [http://doi.org/10.1016/S0163-7258\(01\)00137-1](http://doi.org/10.1016/S0163-7258(01)00137-1)
- Blois, M. S. (1958).** Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bordignon-Luiz, M. T., Gauche, C., Gris, E. F., & Falcão, L. D. (2007).** Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 594-599. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.02.022>
- Botta, B., Menendez, P., Zappia, G., de Lima, R. A., Torge, R., & Monachea, G. D. (2009).** Prenylated isoflavonoids: Botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Current Medicinal Chemistry*, 16(26), 3414-3468.
- Bovy, A., Schijlen, E., & Hall, R. D. (2007).** Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): the potential for metabolomics. *Metabolomics*, 3(3), 399-412. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0074-2>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brouillard R.** Chemical structure of anthocyanins. In P. Markakis (Ed.). *Anthocyanins as food colours*. New York: Academic Press; 1982. p.1-40.
- Brownmiller, C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2008).** Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed

Blueberry Products. *Journal of Food Science*, 73(5), H72-H79. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00761.x>

Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (3. éd. rev. et augm.). Paris: Ed. Tec & doc-Lavoisier [u.a.].

Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S., & Kroh, L. W. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(21), 3229-3235. <http://doi.org/10.1002/rcm.2720>

Calias, P., Galanopoulos, T., Maxwell, M., Khayat, A., Graves, D., Antoniadis, H. N., & d'Alarcao, M. (1996). Synthesis of inositol 2-phosphate-quercetin conjugates. *Carbohydrate Research*, 292, 83-90. [http://doi.org/10.1016/S0008-6215\(96\)91029-0](http://doi.org/10.1016/S0008-6215(96)91029-0)

Cardoso, L. de M., Pinheiro, S. S., de Carvalho, C. W. P., Queiroz, V. A. V., de Menezes, C. B., Moreira, A. V. B., ... Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2015). Phenolic compounds profile in sorghum processed by extrusion cooking and dry heat in a conventional oven. *Journal of Cereal Science*, 65, 220-226. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.06.015>

Cejudo-Bastante, M. J., Herмосín-Gutiérrez, I., Castro-Vázquez, L. I., & Pérez-Coello, M. S. (2011). Hydroxylation and Bottle Storage of Chardonnay White Wines: Effects on Color-Related Phenolics, Volatile Composition, and Sensory Characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 4171-4182. <https://doi.org/10.1021/jf104744q>

Chan, M. M., Mattiacci, J. A., Hwang, H. S., Shah, A., & Fong, D. (2000). Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochemical Pharmacology*, 60(10), 1539-1548.

Chen, Y.-C., Shen, S.-C., Lee, W.-R., Hou, W.-C., Yang, L.-L., & Lee, T. J. F. (2001). Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82(4), 537-548. <http://doi.org/10.1002/jcb.1184>

Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B., & Lee, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99(2), 381-387. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.004>

Chuah, A. M., Lee, Y.-C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L.-J., & Matoba, T. (2008). Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry*, 111(1), 20-28. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.022>

Cisneros-Zevallos, L. (2003). The Use of Controlled Postharvest Abiotic Stresses as a Tool for Enhancing the Nutraceutical Content and Adding-Value of Fresh Fruits and Vegetables. *Journal of Food Science*, 68(5), 1560-1565. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb12291.x>

Cisse, M., Vaillant, F., Acosta, O., Dhuique-Mayer, C., & Dornier, M. (2009). Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from Blood Orange, Blackberry, and Roselle Using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6285-6291. <http://doi.org/10.1021/jf900836b>

- Cook, N., & Samman, S. (1996).** Flavonoids--Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), 66-76. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/0955-2863(95)00168-9)
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., ... Berghe, D. V. (1998).** Structure–Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *Journal of Natural Products*, 61(1), 71-76. <http://doi.org/10.1021/np970237h>
- Croft, K. D. (1998).** The Chemistry and Biological Effects of Flavonoids and Phenolic Acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1 TOWARDS PROLO), 435-442. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x>
- da Costa, E. M., Filho, J. M. B., do Nascimento, T. G., & Macêdo, R. O. (2002).** Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. *Thermochimica Acta*, 392-393, 79-84. [http://doi.org/10.1016/S0040-6031\(02\)00087-4](http://doi.org/10.1016/S0040-6031(02)00087-4)
- Dairi, S., Galeano-Díaz, T., Acedo-Valenzuela, M. I., Godoy-Caballero, M. P., Dahmoune, F., Remini, H., & Madani, K. (2015).** Monitoring oxidative stability and phenolic compounds composition of myrtle-enriched extra virgin olive during heating treatment by flame, oven and microwave using reversed phase dispersive liquid–liquid microextraction (RP-DLLME)-HPLC-DAD-FLD method. *Industrial Crops and Products*, 65, 303-314. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.035>
- Dall'Acqua, S., Miolo, G., Innocenti, G., & Caffieri, S. (2012).** The Photodegradation of Quercetin: Relation to Oxidation. *Molecules*, 17(12), 8898-8907. <http://doi.org/10.3390/molecules17088898>
- Delattre, J., Beaudoux, J.-L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Paris: Éditions Tec & doc : Éditions médicales internationales.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999).** Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65(4), 337-353. [http://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00120-4](http://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00120-4)
- Dietrych-Szostak, D., & Oleszek, W. (1999).** Effect of Processing on the Flavonoid Content in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4384-4387. <http://doi.org/10.1021/jf990121m>
- Dong, J., Ma, X., Fu, Z., & Guo, Y. (2011).** Effects of microwave drying on the contents of functional constituents of *Eucommia ulmoides* flower tea. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1102-1110. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.026>
- Dyrby, M., Westergaard, N., & Stapelfeldt, H. (2001).** Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry*, 72(4), 431-437. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00251-X](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00251-X)

- Estime**, N., Teychené, S., Autret, J.-M., & Biscans, B. (2010). Influence of pH, Temperature and Impurities on the Solubility of an Active Pharmaceutical Ingredient (API). *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 8(1). <https://doi.org/10.2202/1542-6580.2099>
- Ewald**, C., Fjelkner-Modig, S., Johansson, K., Sjöholm, I., & Åkesson, B. (1999). Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry*, 64(2), 231-235. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00136-8](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00136-8)
- Fan**, W., Qian, S., Qian, P., & Li, X. (2016). Antiviral activity of luteolin against Japanese encephalitis virus. *Virus Research*, 220, 112-116. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.021>
- Fargeix**, G. (2000). Étude des mécanismes d'oxydation de flavonoïdes en relation avec leur activité antioxydante: effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoïdes. Consulté à l'adresse <https://books.google.fr/books?id=cHr1XwAACAAJ>
- Fracassetti**, D., Del Bo', C., Simonetti, P., Gardana, C., Klimis-Zacas, D., & Ciappellano, S. (2013). Effect of Time and Storage Temperature on Anthocyanin Decay and Antioxidant Activity in Wild Blueberry (*Vaccinium angustifolium*) Powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(12), 2999-3005. <http://doi.org/10.1021/jf3048884>
- Frankel**, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200010\)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4)
- Friedman**, M. (1997). Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1523-1540. <https://doi.org/10.1021/jf960900s>
- Fuhrman**, B., Lavy, A., & Aviram, M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(3), 549-554.
- Fuleki**, T., & Ricardo-da-Silva, J. M. (2003). Effects of Cultivar and Processing Method on the Contents of Catechins and Procyanidins in Grape Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 640-646. <http://doi.org/10.1021/jf020689m>
- Galeotti**, F., Barile, E., Curir, P., Dolci, M., & Lanzotti, V. (2008). Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry Letters*, 1(1), 44-48. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2007.10.001>
- Gamet-Payrastre**, L., Manenti, S., Gratacap, M.-P., Tulliez, J., Chap, H., & Payrastre, B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology: The Vascular System*, 32(3), 279-286. [http://doi.org/10.1016/S0306-3623\(98\)00220-1](http://doi.org/10.1016/S0306-3623(98)00220-1)
- Gerard**, K. A., & Roberts, J. S. (2004). Microwave heating of apple mash to improve juice yield and quality. *LWT - Food Science and Technology*, 37(5), 551-557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.12.006>

- Gilani, A. H., & Janbaz, K. H. (1993).** Protective effect of *Artemisia scoparia* extract against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *General Pharmacology: The Vascular System*, 24(6), 1455-1458. [http://doi.org/10.1016/0306-3623\(93\)90434-Y](http://doi.org/10.1016/0306-3623(93)90434-Y)
- Gilani, A. H., Janbaz, K. H., & Shah, B. H. (1997).** Quercetin exhibits hepatoprotective activity in rats. *Biochemical Society Transactions*, 25(4), S619.
- Ginwala, R., McTish, E., Raman, C., Singh, N., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P., ... Khan, Z. K. (2016).** Apigenin, a Natural Flavonoid, Attenuates EAE Severity Through the Modulation of Dendritic Cell and Other Immune Cell Functions. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 11(1), 36-47. <https://doi.org/10.1007/s11481-015-9617-x>
- Glazer, A. N. (1990).** Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods in Enzymology*, 186, 161-168.
- Goncalves, J. (2001).** antiviral effect of flavonoid-rich extracts of (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine*, 8(6), 477-480. [https://doi.org/10.1078/S0944-7113\(04\)70069-0](https://doi.org/10.1078/S0944-7113(04)70069-0)
- Gradinaru, G., Biliaderis, C. G., Kallithraka, S., Kefalas, P., & Garcia-Viguera, C. (2003).** Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry*, 83(3), 423-436. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00125-0](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00125-0)
- Guan, X., Zhou, Y., Liang, X., Xiao, J., He, L., & Li, J. (2012).** Effects of compounds found in *Nidus Vespa* on the growth and cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Research*, 167(2), 61-68. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2011.03.002>
- Guerra, M., Amorati, R., & Pedulli, G. F. (2004).** Water Effect on the O–H Dissociation Enthalpy of Para-Substituted Phenols: a DFT Study. *The Journal of Organic Chemistry*, 69(16), 5460-5467. <https://doi.org/10.1021/jo0495236>
- Halliwell, B. (1994).** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, 344(8924), 721-724. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92211-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92211-X)
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007).** *Free radicals in biology and medicine* (4th ed). Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)
- Harbourne, N., Jacquier, J. C., Morgan, D. J., & Lyng, J. G. (2008).** Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. *Food Chemistry*, 111(1), 204-208. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.023>
- Hare, J. M. (2004).** Nitroso–Redox Balance in the Cardiovascular System. *New England Journal of Medicine*, 351(20), 2112-2114. <http://doi.org/10.1056/NEJMe048269>

- Harris, S., Brunton, N., Tiwari, U., & Cummins, E. (2015).** Human exposure modelling of quercetin in onions (*Allium cepa* L.) following thermal processing. *Food Chemistry*, 187, 135-139. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.035>
- Havsteen, B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2-3), 67-202. [http://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](http://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X)
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Hendry, G. A. F., Atherton, N. M., Seel, W., & Leprince, O. (1994).** The occurrence of a stable quinone radical accumulating in vivo during natural and induced senescence in a range of plants, p. 501-503.
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., & de Pascual-Teresa, S. (2010).** Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(3), 691-696. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.097>
- Higashio, H., Hirokane, H., Sato, F., Tokuda, S., & Uragami, A. (2007).** ENHANCEMENT OF FUNCTIONAL COMPOUNDS IN ALLIUM VEGETABLES WITH UV RADIATION. *Acta Horticulturae*, (744), 357-362. <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.744.39>
- Hodek, P., Trefil, P., & Stiborová, M. (2002).** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, 139(1), 1-21. [http://doi.org/10.1016/S0009-2797\(01\)00285-X](http://doi.org/10.1016/S0009-2797(01)00285-X)
- Hollman, P. C. ., & Katan, M. . (1999).** Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10), 937-942. [http://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00079-4](http://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00079-4)
- Huang, Y.-C., Chang, Y.-H., & Shao, Y.-Y. (2006).** Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chemistry*, 98(3), 529-538. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.083>
- Huk, I., Brovkovich, V., Nanobash Vili, J., Weigel, G., Neumayer, C., Partyka, L., ... Malinski, T. (1998).** Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *The British Journal of Surgery*, 85(8), 1080-1085. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2168.1998.00787.x>
- Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M. M., & Martínez-Navarrete, N. (2011).** Changes in flavonoid content of grapefruit juice caused by thermal treatment and storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(2), 153-162. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.12.010>
- Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M. M., & Martínez-Navarrete, N. (2013).** Jam processing and storage effects on β -carotene and flavonoids content in grapefruit. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 736-744. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.019>

Ioannou, I., & Ghoul, M. (2012). Biological Activities and Effects of Food Processing on Flavonoids as Phenolic Antioxidants. In M. Petre (éd.), *Advances in Applied Biotechnology*. InTech. Consulté à l'adresse <http://www.intechopen.com/books/advances-in-applied-biotechnology/biological-activities-and-effects-of-food-processing-on-flavonoids-as-phenolic-antioxidants>

Ioannou, I., Hafsa, I., Hamdi, S., Charbonnel, C., & Ghoul, M. (2012). Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 208-217. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.006>

Islek, M., Nilufer-Erdil, D., & Knuthsen, P. (2015). Changes in Flavonoids of Sliced and Fried Yellow Onions (*Allium cepa* L. var. zittauer) During Storage at Different Atmospheric, Temperature and Light Conditions: Flavonoid Changes in Sliced and Fried Onions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(4), 357-368. <http://doi.org/10.1111/jfpp.12240>

Jassim, S. A. A., & Naji, M. A. (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 412-427. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x>

Jeong, S.-M., Kim, S.-Y., Kim, D.-R., Jo, S.-C., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S.-C. (2004). Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Activity of Extracts from Citrus Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3389-3393. <http://doi.org/10.1021/jf049899k>

Jiménez, N., Bohuon, P., Lima, J., Dornier, M., Vaillant, F., & Pérez, A. M. (2010). Kinetics of Anthocyanin Degradation and Browning in Reconstituted Blackberry Juice Treated at High Temperatures (100–180 °C). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2314-2322. <http://doi.org/10.1021/jf902381e>

Jiménez-Aguilar, D. M., Ortega-Regules, A. E., Lozada-Ramírez, J. D., Pérez-Pérez, M. C. I., Vernon-Carter, E. J., & Welti-Chanes, J. (2011). Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6), 889-894. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.04.012>

Johnson, G. H., & Fritsche, K. (2012). Effect of Dietary Linoleic Acid on Markers of Inflammation in Healthy Persons: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(7), 1029-1041.e15. <http://doi.org/10.1016/j.jand.2012.03.029>

Juániz, I., Ludwig, I. A., Huarte, E., Pereira-Caro, G., Moreno-Rojas, J. M., Cid, C., & De Peña, M.-P. (2016). Influence of heat treatment on antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of selected vegetables. *Food Chemistry*, 197, 466-473. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.139>

Kırca, A., & Cemeroglu, B. (2003). Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chemistry*, 81(4), 583-587. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00500-9](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00500-9)

Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., Higa, S., Wang, W., Suemura, M., Tanaka, T. (2000). Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in

NC/Nga mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1 Pt 1), 159-166. <http://doi.org/10.1067/mai.2000.107194>

Krings, U. (2000). Antioxidant activity of extracts from roasted wheat germ. *Food Chemistry*, 71(1), 91-95. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00148-5](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00148-5)

Kuo, S. M. (1997). Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 8(1), 47-69.

Landete, J. M. (2012). Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(10), 936-948. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.513779>

Lee, S. U., Lee, J. H., Choi, S. H., Lee, J. S., Ohnisi-Kameyama, M., Kozukue, N., Friedman, M. (2008). Flavonoid Content in Fresh, Home-Processed, and Light-Exposed Onions and in Dehydrated Commercial Onion Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8541-8548. <http://doi.org/10.1021/jf801009p>

Lee, W., Ku, S.-K., & Bae, J.-S. (2014). Vascular barrier protective effects of orientin and isoorientin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Vascular Pharmacology*, 62(1), 3-14. <http://doi.org/10.1016/j.vph.2014.04.006>

Lombard, K., Peffley, E., Geoffriau, E., Thompson, L., & Herring, A. (2005). Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(6), 571-581. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.03.027>

López-Rubira, V., Conesa, A., Allende, A., & Artés, F. (2005). Shelf life and overall quality of minimally processed pomegranate arils modified atmosphere packaged and treated with UV-C. *Postharvest Biology and Technology*, 37(2), 174-185. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.04.003>

Lou, S.-N., Lai, Y.-C., Huang, J.-D., Ho, C.-T., Ferng, L.-H. A., & Chang, Y.-C. (2015). Drying effect on flavonoid composition and antioxidant activity of immature kumquat. *Food Chemistry*, 171, 356-363. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.119>

Luo, Z., Murray, B. S., Ross, A.-L., Povey, M. J. W., Morgan, M. R. A., & Day, A. J. (2012). Effects of pH on the ability of flavonoids to act as Pickering emulsion stabilizers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.11.027>

Majhenič, L., Škerget, M., & Knez, Ž. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104(3), 1258-1268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.074>

Makris, D. P., & Rossiter, J. T. (2000). Heat-Induced, Metal-Catalyzed Oxidative Degradation of Quercetin and Rutin (Quercetin 3- O -Rhamnosylglucoside) in Aqueous Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3830-3838. <http://doi.org/10.1021/jf0001280>

Makris, D. P., & Rossiter, J. T. (2001). Domestic Processing of Onion Bulbs (*Allium cepa*) and Asparagus Spears (*Asparagus officinalis*): Effect on Flavonol Content and Antioxidant

Status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3216-3222. <http://doi.org/10.1021/jf001497z>

Manach, C., & Donovan, J. L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*, 38(8), 771-785. <https://doi.org/10.1080/10715760410001727858>

Martin, M. J., Marhuenda, E., Perez-Guerrero, C., & Franco, J. M. (1994). Antiulcer Effect of Naringin on Gastric Lesions Induced by Ethanol in Rats. *Pharmacology*, 49(3), 144-150. <http://doi.org/10.1159/000139228>

McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.

Merzoug, S., Toumi, M. L., & Tahraoui, A. (2014). Quercetin mitigates Adriamycin-induced anxiety- and depression-like behaviors, immune dysfunction, and brain oxidative stress in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387(10), 921-933. <https://doi.org/10.1007/s00210-014-1008-y>

Middleton, E., & Kandaswami, C. (1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology*, 43(6), 1167-1179. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90489-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90489-6)

Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673-751.

Milbury, P. E., & Richer, A. C. (2008). *Understanding the antioxidant controversy: scrutinizing the « fountain of youth »*. Westport, Conn: Praeger.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 84(4), 407-412.

Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655-1666. <https://doi.org/10.1021/jf803537k>

Morais, H., Ramos, C., Forgács, E., Cserhádi, T., & Oliviera, J. (2002). Influence of storage conditions on the stability of monomeric anthocyanins studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 770(1-2), 297-301.

Murakami, M., Hasegawa, M., & Igawa, H. (2004). Theoretical and experimental studies on the thermal ring-opening reaction of cyclobutene having a stannyl substituent at the 3-position. *The Journal of Organic Chemistry*, 69(2), 587-590. <http://doi.org/10.1021/jo035433+>

Nayak, B., Liu, R. H., & Tang, J. (2015). Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(7), 887-918. <http://doi.org/10.1080/10408398.2011.654142>

- Ndhlala**, A. R., Moyo, M., & Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules* (Basel, Switzerland), 15(10), 6905-6930. <https://doi.org/10.3390/molecules15106905>
- Nicoli**, M. ., Anese, M., & Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 10(3), 94-100. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00023-0](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00023-0)
- Nohynek**, L. J., Alakomi, H.-L., Kähkönen, M. P., Heinonen, M., Helander, I. M., Oksman-Caldentey, K.-M., & Puupponen-Pimiä, R. H. (2006). Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action Against Severe Human Pathogens. *Nutrition and Cancer*, 54(1), 18-32. http://doi.org/10.1207/s15327914nc5401_4
- Odrizola-Serrano**, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Influence of Storage Temperature on the Kinetics of the Changes in Anthocyanins, Vitamin C, and Antioxidant Capacity in Fresh-Cut Strawberries Stored under High-Oxygen Atmospheres. *Journal of Food Science*, 74(2), C184-C191. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01075.x>
- Odrizola-Serrano**, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *European Food Research and Technology*, 228(2), 239-248. <http://doi.org/10.1007/s00217-008-0928-5>
- Ong**, K. C., & Khoo, H.-E. (2000). Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sciences*, 67(14), 1695-1705. [http://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00758-X](http://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00758-X)
- Osawa**, T., & Namiki, M. (1981). A Novel Type of Antioxidant Isolated from Leaf Wax of Eucalyptus leaves. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(3), 735-739. <http://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864583>
- Ou**, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626. <http://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Ouhibi**, C., Attia, H., Rebah, F., Msilini, N., Chebbi, M., Aarouf, J., ... Lachaal, M. (2014). Salt stress mitigation by seed priming with UV-C in lettuce plants: Growth, antioxidant activity and phenolic compounds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 126-133. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.019>
- Özyürek**, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Esin Çelik, S., ... Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*, 3(11), 2439. <https://doi.org/10.1039/c1ay05320e>
- Paniwnyk**, L., Beaufoy, E., Lorimer, J. ., & Mason, T. . (2001). The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 299-301. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00075-4](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00075-4)

- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010).** Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21(1), 3-11. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>
- Pérez-Gregorio, M. R., Regueiro, J., González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2011).** Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage. *Food Control*, 22(7), 1108-1113. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.006>
- Pérusse, P., & Leech, D. (2003).** A Voltammetric Assay of Antioxidants and Inhibitors of Soybean Lipoxygenase. *Electroanalysis*, 15(5-6), 573-578. <https://doi.org/10.1002/elan.200390071>
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2004).** Interaction among Phenols in Food Fortification: Negative Synergism on Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1177-1180. <http://doi.org/10.1021/jf0350515>
- Plaza, L., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., & Cano, M. P. (2011).** Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 834-839. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.013>
- Price, K. R., Bacon, J. R., & Rhodes, M. J. C. (1997).** Effect of Storage and Domestic Processing on the Content and Composition of Flavonol Glucosides in Onion (*Allium cepa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 938-942. <http://doi.org/10.1021/jf9605916>
- Qiao, L., Sun, Y., Chen, R., Fu, Y., Zhang, W., Li, X., ... Ye, X. (2014).** Sonochemical Effects on 14 Flavonoids Common in Citrus: Relation to Stability. *PLoS ONE*, 9(2), e87766. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087766>
- Ramešová, Š., Sokolová, R., Degano, I., Bulíčková, J., Žabka, J., & Gál, M. (2012).** On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(2), 975-982. <http://doi.org/10.1007/s00216-011-5504-3>
- Ramešová, Š., Sokolová, R., Tarábek, J., & Degano, I. (2013).** The oxidation of luteolin, the natural flavonoid dye. *Electrochimica Acta*, 110, 646-654. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.06.136>
- Ranilla, L. G., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2009).** Effect of Different Cooking Conditions on Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Some Selected Brazilian Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5734-5742. <http://doi.org/10.1021/jf900527v>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reber, J. D., Eggett, D. L., & Parker, T. L. (2011).** Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(5), 445-452. <http://doi.org/10.3109/09637486.2010.549115>

Redrejo-Rodriguez, M., Tejada-Cano, A., del Carmen Pinto, M., & Macías, P. (2004). Lipoxygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure–activity relation. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 674(1-3), 121-124. <http://doi.org/10.1016/j.theochem.2003.12.021>

Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. University of Helsinki, Helsinki.

Renard, C. M. G. C., Le Quéré, J.-M., Bauduin, R., Symoneaux, R., Le Bourvellec, C., & Baron, A. (2011). Modulating polyphenolic composition and organoleptic properties of apple juices by manipulating the pressing conditions. *Food Chemistry*, 124(1), 117-125. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.113>

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(7), 933-956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

Rodov, V., Tietel, Z., Vinokur, Y., Horev, B., & Eshel, D. (2010). Ultraviolet Light Stimulates Flavonol Accumulation in Peeled Onions and Controls Microorganisms on Their Surface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9071-9076. <http://doi.org/10.1021/jf1016016>

Rodrigues, A. S., Pérez-Gregorio, M. R., García-Falcón, M. S., & Simal-Gándara, J. (2009). Effect of curing and cooking on flavonols and anthocyanins in traditional varieties of onion bulbs. *Food Research International*, 42(9), 1331-1336. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.005>

Rohn, S., Buchner, N., Driemel, G., Rauser, M., & Kroh, L. W. (2007). Thermal Degradation of Onion Quercetin Glucosides under Roasting Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1568-1573. <https://doi.org/10.1021/jf063221i>

Rolland, Y. (2004). Antioxydants naturels végétaux. Oléagineux, Corps gras, Lipides, 11(6), 419-424. <https://doi.org/10.1051/ocl.2004.0419>

Rothwell, J. A., Day, A. J., & Morgan, M. R. A. (2005). Experimental Determination of Octanol–Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4355-4360. <http://doi.org/10.1021/jf0483669>

Sadilova, E., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Thermal Degradation of Acylated and Nonacylated Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 71(8), C504-C512. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00148.x>

Saidman, E., Yurquina, A., Rudyk, R., Molina, M. A. A., & Ferretti, F. H. (2002). A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 585(1-3), 1-13. [http://doi.org/10.1016/S0166-1280\(02\)00027-1](http://doi.org/10.1016/S0166-1280(02)00027-1)

Samper, M. D., Fages, E., Fenollar, O., Boronat, T., & Balart, R. (2013). The potential of flavonoids as natural antioxidants and UV light stabilizers for polypropylene. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(4), 1707-1716. <http://doi.org/10.1002/app.38871>

Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36(2), 177-187.

Serkedjieva, J., & Ivancheva, S. (1998). Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(1), 59-68. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00095-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00095-6)

Sharma, A., & Zhou, W. (2011). A stability study of green tea catechins during the biscuit making process. *Food Chemistry*, 126(2), 568-573. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.044>

Shih, C.-M., Lin, H., Liang, Y.-C., Lee, W.-S., Bi, W.-F., & Juan, S.-H. (2004). Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 496(1-3), 41-48. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.06.016>

Shin, J.-E., Kim, J.-M., Bae, E.-A., Hyun, Y.-J., & Kim, D.-H. (2005). In Vitro Inhibitory Effect of Flavonoids on Growth, Infection and Vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Planta Medica*, 71(3), 197-201. <http://doi.org/10.1055/s-2005-837816>

Sirmah, P., Dumarçay, S., Masson, E., & Gérardin, P. (2009). Unusual amount of (-)-mesquitol from the heartwood of *Prosopis juliflora*. *Natural Product Research*, 23(2), 183-189. <https://doi.org/10.1080/14786410801940968>

Slimestad, R., & Verheul, M. (2009). Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(8), 1255-1270. <http://doi.org/10.1002/jsfa.3605>

Smith, G. J., Thomsen, S. J., Markham, K. R., Andary, C., & Cardon, D. (2000). The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 136(1-2), 87-91. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(00\)00320-8](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(00)00320-8)

Sochor, J., Ryvolova, M., Krystofova, O., Salas, P., Hubalek, J., Adam, V., ... Kizek, R. (2010). Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*, 15(12), 8618-8640. <https://doi.org/10.3390/molecules15128618>

Sroka, Z. (2005). Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Zeitschrift Für Naturforschung, C, Journal of Biosciences*, 60(11-12), 833-843.

Stahl, L., Miller, K. B., Apgar, J., Sweigart, D. S., Stuart, D. A., McHale, N., ... Hurst, W. J. (2009). Preservation of Cocoa Antioxidant Activity, Total Polyphenols, Flavan-3-ols, and Procyanidin Content in Foods Prepared with Cocoa Powder. *Journal of Food Science*, 74(6), C456-C461. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01226.x>

Stefek, M. (2011). Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. *Interdisciplinary Toxicology*, 4(2). <http://doi.org/10.2478/v10102-011-0013-y>

Stintzing, F. C., Hoffmann, M., & Carle, R. (2006). Thermal degradation kinetics of isoflavone aglycones from soy and red clover. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(4-5), 373-377. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500187>

Stoclet, J.-C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M.-H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., & Schini-Kerth, V. B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 299-313. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.034>

Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F., & Gil, M. I. (2000). Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 23, p. 739-795). Elsevier. Consulté à l'adresse <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572599500801416>

Tommasini, S., Calabrò, M. L., Donato, P., Raneri, D., Guglielmo, G., Ficarra, P., & Ficarra, R. (2004). Comparative photodegradation studies on 3-hydroxyflavone: influence of different media, pH and light sources. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(2), 389-397. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00586-7](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00586-7)

Tournaire, C., Croux, S., Maurette, M.-T., Beck, I., Hocquaux, M., Braun, A. M., & Oliveros, E. (1993). Antioxidant activity of flavonoids: Efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 19(3), 205-215. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)87086-3](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)87086-3)

Tudela, J. A., Cantos, E., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., & Gil, M. I. (2002). Induction of Antioxidant Flavonol Biosynthesis in Fresh-Cut Potatoes. Effect of Domestic Cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5925-5931. <http://doi.org/10.1021/jf020330y>

Ulbrich, K., Reichardt, N., Braune, A., Kroh, L. W., Blaut, M., & Rohn, S. (2015). The microbial degradation of onion flavonol glucosides and their roasting products by the human gut bacteria *Eubacterium ramulus* and *Flavonifractor plautii*. *Food Research International*, 67, 349-355. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.051>

Ungar, Y., Osundahunsi, O. F., & Shimoni, E. (2003). Thermal Stability of Genistein and Daidzein and Its Effect on Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4394-4399. <http://doi.org/10.1021/jf034021z>

van Acker, S. A., van den Berg, D. J., 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 & Medicine*, 20(3), 331-342.

Verbeyst, L., Oey, I., Van der Plancken, I., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2010). Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. *Food Chemistry*, 123(2), 269-274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.027>.

Villar, A., Gascó, M. A., & Alcaraz, M. J. (1987). Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 39(7), 502-507.

- Viña, S. Z., & Chaves, A. R. (2008).** Effect of heat treatment and refrigerated storage on antioxidant properties of pre-cut celery (*Apium graveolens* L.). *International Journal of Food Science & Technology*, 43(1), 44-51. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01380.x>
- Viña, S. Z., Olivera, D. F., Marani, C. M., Ferreyra, R. M., Mugridge, A., Chaves, A. R., & Mascheroni, R. H. (2007).** Quality of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. *gemmifera* DC) as affected by blanching method. *Journal of Food Engineering*, 80(1), 218-225. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.049>
- Wang, C. Y., Chen, C.-T., & Wang, S. Y. (2009a).** Changes of flavonoid content and antioxidant capacity in blueberries after illumination with UV-C. *Food Chemistry*, 117(3), 426-431. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.037>
- Wang, S. Y., Chen, C.-T., & Wang, C. Y. (2009b).** The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. *Food Chemistry*, 112(3), 676-684. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.032>
- Wang, W.-D., & Xu, S.-Y. (2007).** Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82(3), 271-275. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.01.018>
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., & Locke, S. (1985).** Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letters*, 187(1), 33-37. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)81208-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)81208-4)
- Yamamura, S., Ozawa, K., Ohtani, K., Kasai, R., & Yamasaki, K. (1998).** Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry*, 48(1), 131-136. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01112-6](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01112-6)
- Yang, Z., Han, Y., Gu, Z., Fan, G., & Chen, Z. (2008).** Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(3), 341-347. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.09.001>
- Yen, G. (2000).** Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chemistry*, 70(4), 437-441. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00108-4](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00108-4)
- Zafrilla, P., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (2001).** Effect of Processing and Storage on the Antioxidant Ellagic Acid Derivatives and Flavonoids of Red Raspberry (*Rubus idaeus*) Jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3651-3655. <http://doi.org/10.1021/jf010192x>
- Zenkevich, I. G., Eshchenko, A. Y., Makarova, S. V., Vitenberg, A. G., Dobryakov, Y. G., & Utsal, V. A. (2007).** Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 12(3), 654-672.
- Zhang, M., Chen, H., Li, J., Pei, Y., & Liang, Y. (2010).** Antioxidant properties of tartary buckwheat extracts as affected by different thermal processing methods. *LWT - Food Science and Technology*, 43(1), 181-185. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.020>

Zheng, H., & Lu, H. (2011). Use of kinetic, Weibull and PLSR models to predict the retention of ascorbic acid, total phenols and antioxidant activity during storage of pasteurized pineapple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5), 1273-1281. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.023>

Zielinski, H., Michalska, A., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., & Piskula, M. K. (2009). Changes in Protein Quality and Antioxidant Properties of Buckwheat Seeds and Groats Induced by Roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4771-4776. <http://doi.org/10.1021/jf900313e>

Zimeri, J., & Tong, C. H. (1999). Degradation Kinetics of (-)-Epigallocatechin Gallate as a Function of pH and Dissolved Oxygen in a Liquid Model System. *Journal of Food Science*, 64(5), 753-758. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15905.x>

Zoric, Z., Dragovic-Uzelac, V., Pedisic, S., Kurtanzek, Z., & Garofulic, I. (2014). Kinetics of the Degradation of Anthocyanins, Phenolic Acids and Flavonols During Heat Treatments of Freeze-Dried Sour Cherry Marasca Paste. *Food Technology and biotechnology*.

Annexe 1

La modélisation peut estimer par différents cinétiques d'ordre :

- La cinétique d'ordre 0

$$C_t - C_0 = kt$$

- La cinétique d'ordre 1

$$\ln(C_t / C_0) = -kt$$

- La cinétique d'ordre 2

$$\frac{1}{C_t} - \frac{1}{C_0} = kt$$

On peut déterminer la cinétique d'ordre appropriée par la valeur du coefficient de détermination (R^2). En effet, le coefficient de détermination est un indicateur qui permet de juger la qualité d'une régression linéaire.

Modélisation des cinétiques de dégradation :

Cinétique de dégradation :

Pour estimer la cinétique de dégradation moléculaire, on utilise la cinétique d'ordre. En effet, molécule \rightarrow produits de dégradation.

La vitesse est directement proportionnelle à la concentration, et l'équation de vitesse est :

$$V = -dC/dt = kC \quad , \quad dC/C = -kdt$$

L'intégration donne :

$$\int_{C_0}^{C_t} dC/C = - \int_0^t kdt$$

$$\ln C_t - \ln C_0 = -kt \quad \text{Ou} \quad \ln(C_t / C_0) = -kt$$

Ainsi une réaction de premier ordre est caractérisée par une dépendance linéaire de $\ln(C)$ en fonction du temps. La constante k est mesurée en $[\text{min}^{-1}]$.

Modèle Arrhenius :

Presque toutes les réactions chimiques se produisent plus rapidement lorsqu'on élève la température. Donc, l'équation d'Arrhenius permet de déterminer l'énergie d'activation d'une réaction ou d'un processus.

Annexe 2

Article

**(Effect of heated naringenin on immunomodulatory properties
and cellular antioxidant activity)**

Effect of heated naringenin on immunomodulatory properties and cellular antioxidant activity

Mouna Maatouk^{1,2} · Dorra Elgueder^{1,2} · Nadia Mustapha^{1,2} · Hind Chaaban³ ·
Imen Mokdad Bzéouich^{1,2} · Irina Loannou³ · Soumaya Kilani^{1,2} · Mohamed Ghoul³ ·
Kamel Ghedira^{1,2} · Leila Chekir-Ghedira^{1,2}

Received: 19 May 2016 / Revised: 15 August 2016 / Accepted: 31 August 2016
© Cell Stress Society International 2016

Abstract Naringenin is one of the most popular flavonoids derived from citrus. It has been reported to be an effective anti-inflammatory compound. Citrus fruit may be used raw, cooked, stewed, or boiled. The present study was conducted to investigate the effect of thermal processes on naringenin in its immunomodulatory and cellular antioxidant activities. The effects of flavonoids on B and T cell proliferation were assessed on splenocytes stimulated or not with mitogens. However, their effects on cytotoxic T lymphocyte (CTL) and natural killer (NK) activities were assessed in splenocytes co-incubated with target cells. The amount of nitric oxide production and the lysosomal enzyme activity were evaluated in vitro on mouse peritoneal macrophages. Cellular antioxidant activity in splenocytes and macrophages was determined by measuring the fluorescence of the dichlorofluorescein (DCF). Our findings revealed that naringenin induces B cell proliferation and enhances NK activity. The highest concentration of native naringenin exhibits a significant proliferation of T cells, induces CTL activity, and inhibits cellular oxidation in macrophages. Conversely, it was observed that when heat-processed, naringenin improves the cellular antioxidant activity in splenocytes, increases the cytotoxic activity of NK cells,

and suppresses the cytotoxicity of T cells. However, heat treatment maintains the anti-inflammatory potency of naringenin.

Keywords Naringenin · Heated naringenin · Immunomodulation · Cellular antioxidant · Anti-inflammatory potency

Introduction

Many factors affecting immune activity, such as genetic mutations, environmental exposure, and immunomodulatory treatments, may bolster a carcinogenic environment, leading to an increase in the incidence of many autoimmune diseases and cancers (Alexandrescu et al. 2011; Franks and Slansky 2012; Grivennikov et al. 2010; Sansone and Bromberg 2011). Thus, a large number of plant extracts, used in traditional medicines, and flavonoids are being extensively explored for their potential immunomodulating activities (Krifa et al. 2013; Lopez-Posadas et al. 2008). Moreover, many polyphenols, synthesized by plants during periods of stress such as drought or sun exposure, confer stress tolerance for the animals that consume them. This phenomenon of xenohormesis is a more speculative theory, suggesting that animals and fungi are able to sense chemical signals produced by plants and other autotrophs in response to stress. Thus, plants' secondary metabolites, such as resveratrol, quercetin, and probably naringenin produced under stressful conditions, serve as a molecular warning to the animals who eat them and who, in turn, are protected against unfavorable conditions. Moreover, the theory predicts that "xenohormetic" molecules bind to conserved domains in proteins, both as an agonist on one enzyme and as an antagonist against another. This might explain the presumed variety of underlying action mechanisms, which all serve to protect the animal consumer (Baur and

✉ Leila Chekir-Ghedira
leila.chekir@laposte.net

¹ Unité des Substances Naturels Bioactives et Biotechnologie, Faculté de Pharmacie de Monastir, Université de Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisia

² Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté de Médecine Dentaire de Monastir, Université de Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisia

³ Laboratoire d'ingénierie des Biomolécules, ENSAIA-INPL, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Sinclair 2008; Hooper et al. 2010; Howitz and Sinclair 2008). Moreover, plants and foods rich in flavonoids are generally eaten not in the raw state but after having undergone a stress such as heating, boiling, or deep frying. Therefore, in this present work, we examined the effect of heating on the immunomodulatory properties of naringenin. Naringenin is a flavanone present in citrus fruits (Orallo et al. 2005), grape fruits (Ribeiro and Ribeiro 2008), orange juices (Silva et al. 2014), and tomato (Vallverdu-Queralt et al. 2012). Various pharmacological activities of NG, including antibacterial (Ng'uni et al. 2015), antiviral (Lulu et al. 2015; Meng et al. 2015), antidiabetic (Bhattacharya et al. 2014; Priscilla et al. 2014), cardioprotective (Kara et al. 2014), neuroprotective (Raza et al. 2013), and nephroprotective effects (Hermenean et al. 2013), were described. Previous studies have also reported that naringenin has antioxidative (Cavia-Saiz et al. 2010; Knežević and Petlevski 2014), anti-inflammatory (Li et al. 2015; Wu et al. 2015), and anticancer (Lin et al. 2014) activities. The aim of this study was to investigate and to compare the immunomodulatory activity and cellular antioxidant potential of native naringenin (NG) and heated naringenin (hNG).

Materials and methods

Reagents

Native and thermally treated naringenins were provided by the Laboratory of Biomolecular Engineering, ENSAIA-INPL, University of Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy.

Thermal treatment

The treatment of naringenin was conducted at 130 °C for 2 h by autoclaving at the Biomolecules Engineering Laboratory of the University of Lorraine, France. Flavonoids were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, 98 %) stock solutions before being added to the cell culture medium. The final concentration of DMSO never exceeded 0.1 % (v/v).

Animals

Specific pathogen-free male BALB/c mice (20–22 g) were obtained from the Pasteur Institute (Tunis, Tunisia). The mice were housed under standard conditions of temperature, humidity, and light (12 h light/dark) in an accredited pathogen-free facility. They were fed a commercial pellet diet and water ad libitum throughout the experimental periods. All experiments were performed in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals as published by the US National Institutes of Health. All experiments received the explicit approval of the Ethics Animal Committee in Tunisia.

Preparation of primary splenocytes and macrophages

Spleen mice lymphocytes were obtained as previously reported (Limem et al. 2011; Mustapha et al. 2015). After washing with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), cells were re-suspended in a complete Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 medium (Gibco BRL) containing 10 % fetal bovine serum (FBS; Gibco) and 100 mg/ml gentamicin (Gibco BRL, Paisley, UK). The other mice were used to provide peritoneal macrophages as previously described (Kilani-Jaziri et al. 2015). Cell viability was assessed using the trypan blue exclusion technique.

Cell treatment

Splenocytes were treated with various concentrations of molecules, and optimal concentrations of lectin (5 µg/ml) and lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* 0127:B8 (5 µg/ml) were added to each well separately for priming T and B cells, respectively. Macrophages (3×10^5 cells per well) were incubated with various concentrations of flavanones and with or without the addition of LPS (5 µg/ml) solubilized in the complete RPMI 1640 medium (Manosroi et al. 2003). The cells were maintained at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere.

T and B cell proliferation assay

A lymphocyte proliferation assay was assessed by the mitochondrion-dependent reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) to purple formazan (Mosmann 1983). Splenocyte suspension, in the RPMI 1640 medium (2.5×10^6 cells/ml; 100 µl aliquot/well), was pre-incubated in a 96-well plate for 24 h, before the addition of both mitogen (LPS or lectin, each at 5 µg/ml), and the tested compound was solubilized in the RPMI 1640 medium. Cells were then incubated at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere for an additional period 48 h. Thereafter, 40 µl of MTT (5 mg/ml) was added to RPMI solution and incubated for 2 h at 37 °C. Plates were then centrifuged again, the MTT was removed from each well, and the formazan was dissolved in 100 µl of DMSO. After incubation at 37 °C for 15 min, absorbance of formazan, formed in each well, was measured at 570 nm in a microplate reader (Thermo Scientific, Vantaa, Finland). The percentage of proliferation was ultimately calculated using the following equation: Proliferation (%) = $100 \times (\text{Abs sample} - \text{Abs control}) / \text{Abs control}$ (Manosroi et al. 2003).

Natural killer cell activity

Natural killer (NK) cell activity was measured as previously described (Sarangi et al. 2006) with minor modifications.

Briefly, the spleens prepared as described above were used as the source of effector cells; isolated splenocytes were seeded into 96-well microtiter plates at 5×10^6 cells/ml. The cells were then stimulated at 37 °C by different concentrations of the tested samples, for 24 h. To activate NK cells, 100 μ l of target K562 cells, at the E:T ratio of 100:1, was added to each well. The plates were then incubated for 4 h at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere. Three kinds of controls were performed: target cell control, blank control, and effector cell control. NK cell activity was calculated as follows: NK activity (%) = $100 \times (\text{Abs T} - (\text{Abs S} - \text{Abs E})) / \text{Abs T}$, where Abs T is the absorbance value of target cell control, Abs S is the absorbance value of the tested samples, and Abs E is the absorbance value of effector cell control.

Cytotoxic T lymphocyte assay

Cytotoxic T lymphocyte (CTL) assay or cell-mediated cytotoxicity was performed using MTT assay. Cytotoxicity of T lymphocyte was measured as previously described for NK cell activity, with modification of target cells. In fact, B16F10 melanoma cells (5×10^4 cells/ml; yielding a 100:1 expected effector-to-target ratio) were added to each well in 50- μ l aliquots. The plates were then incubated for 24 h at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere. CTL value was calculated as follows: CTL value = $100 \% \times ((\text{Abs T} - (\text{Abs S} - \text{Abs E})) / \text{Abs T})$, where Abs T is the absorbance value of target cells control, Abs S is the absorbance value of test samples, and Abs E is the absorbance value of effector cell control.

Assessment of lysosomal enzyme activity

Lysosomal enzyme activity reflected by acid phosphatase (AP) activity in macrophages was measured as previously described by Manosroi et al. (2005), with some modifications. The percentage of lysosomal enzyme activity in treated cells, relative to that in control cells, was calculated as follows: Inhibition of lysosomal enzyme activity (%) = $100 \times (1 - ((\text{Abs sample} - \text{Abs control}) / \text{Abs control}))$.

Measurement of nitrite production

The amount of nitric oxide (NO) released by macrophages was measured by determining the amounts of accumulated nitrite (NO₂⁻) in cell-free supernatants, via the Griess reaction (Green et al. 1982). Briefly, cells were incubated for 48 h in the presence of increasing concentrations of the tested samples. Nitrite amount was then measured by adding 100 μ l Griess reagent (1 % sulfanilamide and 0.1 % naphthalenediamine in 5 % phosphoric acid) to 100 μ l of the harvested culture supernatant. The absorbance at 570 nm was then detected with a microplate reader (Thermo Scientific, Vantaa, Finland).

Cellular antioxidant activity assay

A cellular anti-oxidant activity (CAA) assay, developed by Wolfe and Liu (2007), was employed to measure the antioxidant potential of the tested samples. Briefly, splenocytes and macrophages were seeded at a density of 5×10^5 and 6×10^4 , respectively (in 100 μ l PBS). Triplicate wells were then treated with 10 μ l of each sample (concentrations ranging from 21.6 to 2.7 μ g/ml) along with 5 μ l of a 25 μ M solution of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Fluka, Steinheim, Germany). After 1 h of incubation, a 100- μ l aliquot of 600 μ M and 1.2 mM 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in PBS was applied to the cells. In this method, DCFH-DA is taken up by cells and deacetylated to 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH). Peroxyl radicals generated from ABAP lead to the oxidation of DCFH to fluorescent (dichlorofluorescein, DCF). Accordingly, cells treated with natural compounds that have any antioxidant activity should have lower fluorescence compared to untreated cells. The fluorescence of each well was measured every 5 min for 1 h using a fluorescence microplate reader (BioTek, Winooski, USA) with 538-nm emission and 485-nm excitation filters. Each plate included triplicate control wells containing cells treated with DCFH-DA and the oxidant ABAP and blank wells containing cells with PBS but without the oxidant ABAP. The fluorescence values for the blank controls and the initial fluorescence values were subtracted from the sample fluorescence values. The area under the fluorescence versus time curve was integrated at each time point to calculate the CAA units using the following equation: CAA unit = $100 - (\int \text{SA} / \int \text{CA}) \times 100$, where $\int \text{SA}$ is the integrated area under the sample fluorescence versus time curve and $\int \text{CA}$ is the integrated area under the control fluorescence versus time curve.

Statistical analysis

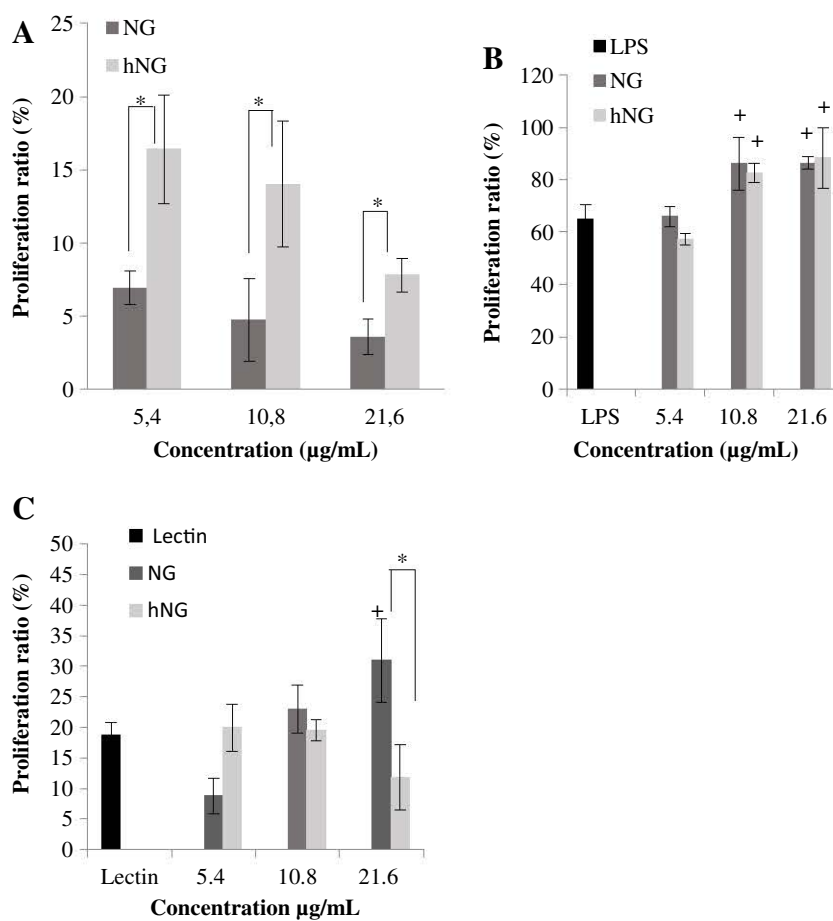
Data are expressed as the arithmetic means \pm SD of three independent experiments. The statistical significance of the results obtained from in vitro studies was evaluated by Student's *t* test, with probability values $p < 0.05$ and $p < 0.01$ being considered as significant.

Results

hNG induces lymphocyte proliferation

The immunomodulatory effect of both treated and native naringenins on murine splenocytes was investigated. It appears that both NG and hNG induced lymphocyte proliferation in the absence of mitogens, when compared to control cells (Fig. 1a).

Fig. 1 Effect of native naringenin (NG) and heated naringenin (hNG) on splenocyte proliferation responses. Cells were incubated for 48 h with **a** increasing concentrations of samples without mitogen, **b** LPS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the absence or presence of flavanones, or **c** lectin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the absence or presence of flavanones. Control cells were incubated with RPMI 1640 only. Data shown are mean percentage proliferation ($\pm\text{SD}$) from three independent experiments. The statistical significance of results was evaluated by Student's *t* test. $^+p < 0.05$, value significantly different compared with control cells; $*p < 0.05$, value significantly different from molecularly treated cells



In contrast, in the presence of LPS, B cell proliferation was more enhanced when incubated either with NG or with hNG at the different tested concentrations, except 5.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, when compared to LPS-treated cells (Fig. 1b).

However, T cell proliferation was induced significantly just with 21.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of NG, whereas concentrations below this level do not induce any proliferation compared to lectin-treated cells (Fig. 1c). On the other hand, heated NG seems to have no inducing effect on T cell proliferation. However, hNG seems to be less efficient compared to NG in inducing a proliferation effect.

hNG enhances natural killer cell activity

NK cells are known to be important effectors in suppressing tumor growth. Thus, we measured the capacity of NG and hNG in enhancing NK activity against K562 myelogenous leukemia cells. It was noteworthy that both molecules provoked no direct cytotoxic activity against K562 cells at the tested concentrations. It is very important to note that both molecules provoked no direct cytotoxic activity against K562 cells, indicating that molecules had enhanced NK cytotoxic activity against these target cells. NG and hNG improve NK cell lysis activity at 5.4 and 21.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. Our

results have shown that NK activity was enhanced by heated naringenin in a dose-dependent manner and by NG in an inverse dose-dependent manner (Fig. 2a).

hNG improves cytotoxic T lymphocyte cell activity

To further compare the immunomodulatory effects of native and treated naringenins, we evaluated the cytotoxic activity of T lymphocytes on target cells using B16F10 as CTL-sensitive cells, as far as NG and hNG exhibited no cytotoxicity effect on B16F10 cells. Following the addition of both molecules NG and hNG, an increase in the activity of cytotoxic cells was recorded in a dose-dependent manner in the presence of naringenin and in an inverse dose-dependent manner in the presence of the treated molecule (Fig. 2b).

hNG inhibits moderately nitric oxide production

The ability of macrophages to induce the release of nitric oxide (NO) was measured through nitrite, which is a stable breakdown product of NO. A potent but not statistically significant increase in the inhibition of nitrite production in the culture medium was induced by both native and heated naringenins. On the other hand, at the concentration of

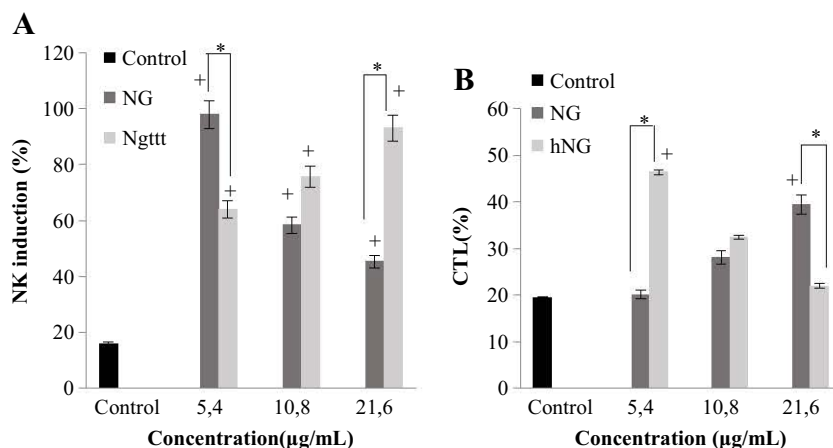


Fig. 2 In vitro effect of various concentrations of native naringenin (NG) and heated naringenin (hNG) on natural killer (NK) cell activity (a) and cytotoxic T cell activity (CTL) in mice. NK induction and CTL activity were measured using the MTT assay. Values shown are mean (\pm SD) percentage cytotoxicity from six different observations. Control was

incubated with K562 target cells in NK cell activity and with B16F10 target cells in CTL activity at a 100:1 expected effector-to-target ratio. The statistical significance of results was evaluated by Student's *t* test. $^+p < 0.05$, value significantly different compared with control cells; $*p < 0.05$, value significantly different from molecularly treated cells

21.6 µg/ml, both molecules induced a significantly high NO release inhibition ($p < 0.05$) (Fig. 3).

hNG inhibits the cellular lysosomal enzyme activity

The inhibition of the lysosomal enzyme activity of mouse macrophages incubated with native and heated naringenins increased in a concentration-dependent manner. Both NG and hNG showed a slight difference in the modulation of phagocytic activity, 12.25 and 7.9 %, respectively, at 21.6 µg/ml (Fig. 4).

Effect of hNG on cellular antioxidant activity

In macrophages, NG significantly inhibited the oxidation of DCFH (39.8 %) in comparison with hNG 32.17 %, at the highest tested concentration (Fig. 5a). It appears that native NG exhibited stronger CAA than hNG.

In contrast, the oxidation of DCFH-DA by peroxy radicals on splenocyte was significantly more inhibited by the treated naringenin, reaching 52.68 and 17.8 % at 21.6 and 10.8 µg/ml, respectively (Fig. 5b). However, NG showed a lower activity

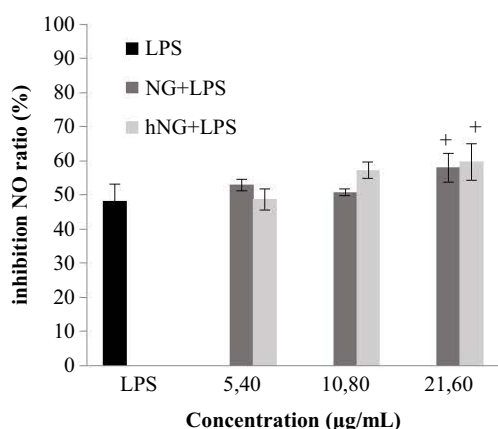


Fig. 3 The inhibition of NO production by native naringenin (NG) and heated naringenin (hNG) in mouse peritoneal macrophages stimulated by LPS (5 mg/ml). Macrophages (2×10^5 cells/well) were incubated in the RPMI 1640 medium in the absence/presence of increasing concentrations of molecules for 48 h. Cells treated with 5 µg/ml LPS were used as positive control. Data shown are mean (\pm SD) percentage of NO production from three independent experiments. Cells incubated in the RPMI 1640 medium alone did not produce NO. The statistical significance of results was evaluated by Student's *t* test. $^+p < 0.05$, value significantly different compared with control cells

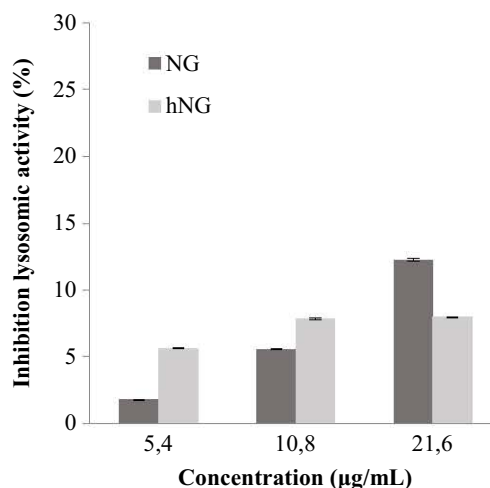
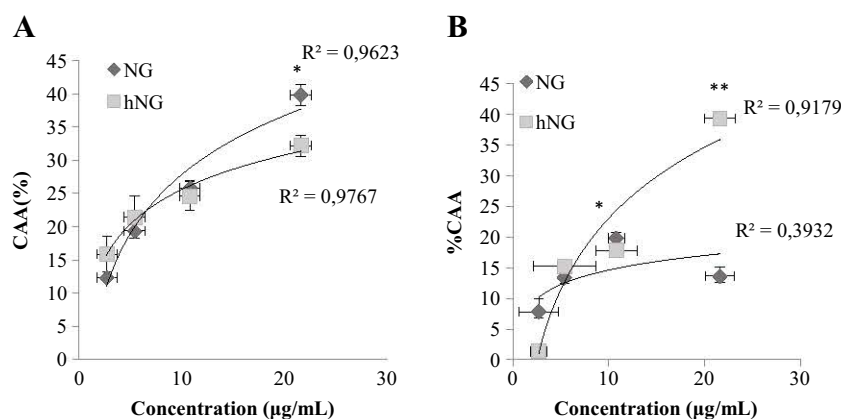


Fig. 4 Inhibition of mouse peritoneal macrophage lysosomal enzyme activity by native naringenin (NG) and heated naringenin (hNG). Macrophages (2×10^5 cells/well) were incubated in the presence of increasing concentrations of molecules for 48 h. Control cells were incubated with the RPMI 1640 medium only. Lysosomal enzyme activity was then assessed as indicated in the "Materials and methods." Data shown are mean (\pm SD) percentages of lysosomal enzyme activity from three independent experiments

Fig. 5 Dose-response curve for oxidation of DCFH to DCF in macrophages (a) and splenocytes (b) using a cellular antioxidant activity assay in the presence of native naringenin (NG) and heated naringenin (hNG). The curves shown in each graph are from a single experiment (mean \pm SD, $n = 3$). * $p < 0.05$, value significantly different from molecularly treated cells. ** $p < 0.01$



with percentage values of 13.8 and 21.3 % at 21.6 and 10.8 $\mu\text{g/ml}$, respectively, with a weak correlation (R^2) of 0.39.1.

Discussion

In response to environmental pollution, the immune system may have changes that make it harder to recognize and target abnormal cells and prevent the development of many cancers. In light of this, many researchers are interested in the use of plant products as immunomodulatory agents like extracts and flavonoids. Most of them were obtained after many treatments, such as thermal processing by cooking, boiling, frying, or roasting, in the food and dietary supplement industries. This may have an impact on flavonoid structures and therefore influence their bioavailability and bioactivities (Rohn et al. 2007). In the present study, we investigated the effect of thermal treatment on biological activities of naringenin on its immunopotency compared to the untreated naringenin. To assess splenocyte proliferation, we used the colorimetric MTT assay. It showed that naringenin did not present any cytotoxicity against the tested cells, thus confirming the results reported by Lopez-Posadas et al. (2008). Lymphocyte subpopulations were inverse dose-dependently activated, with a significant increase in the presence of inherent naringenin compared to the treated naringenin. In order to better understand flavonoid action on T and B cell populations, distinct mitogens were used. Splenocytes incubated with lipopolysaccharide (LPS), known to activate preferentially B cell response (Manosroi et al. 2005; Medzhitov 2001), present a significant proliferation at higher concentrations of the unaffected molecules. Interestingly, both NG and hNG exhibit an obvious effect on B cell activation at the concentration of 10.8 and 21.6 $\mu\text{g/ml}$. Moreover, lectin displays a considerable repertory of carbohydrate specificities. These characteristics, in addition to its ability to stimulate lymphocytes as well as other cells, have made lectin an important diagnostic and experimental tool to study the various aspects of cell growth and differentiation, taking lymphocytes as the cell type (T cells

(Ashraf and Khan 2003). At the highest concentrations, NG activates T cytotoxic cells. This finding supports previous studies which found that naringenin promotes T cell activation and increases the proportion of CD8^+ T cells producing $\text{IFN-}\gamma$ and IL-2 in a mice breast cancer resection model. Heat treatment increased the activity of CTL, and the enhancement of this activity may be due to the generation of novel compounds that can stimulate the secretion of cytokines by cytotoxic T lymphocytes. By activation CTL, hNG is able to reduce the proliferation of cancer cells such as melanoma cells and it may be used as a chemopreventive and/or therapeutic agent. However, these results differ from those of a published study which reported that naringenin inhibited proliferation of activated T lymphocytes, thus suppressing the immune response in contact hypersensitivity (Fang et al. 2010). In fact, cytotoxic T cells prevent the propagation of intracellular pathogens through T cell receptor (TCR) recognition of peptides. Studies of CTL target dynamics were conducted in vitro, but recently, there has been some attention on data from splenic cytotoxicity assays (Hogan et al. 2014; Regoes et al. 2007). This finding corroborates the ideas of Du et al. (2009) who mentioned that naringenin significantly increases the amount of CD8^+ and CD4^+ T cells, expressing the activation marker CD44 in the fibrotic lung of the bleomycin-treated mice receiving naringenin. On the other hand, the low concentration of thermally processed naringenin presents an important tumor-specific cytotoxic activity and a slight proliferation of T cells. Natural killer (NK) cells apply direct cytotoxic activity against tumor targets by cytokine production. Quiet NK cell activity is associated with an increase in the risk of carcinogenesis. Therefore, the focus of recent cancer treatment is to develop drugs that promote NK cells (Battella et al. 2015; Vivier et al. 2012). In fact, we evaluated the cytotoxic effect of NK cells on target cells by co-culturing spleens with K562 myelogenous leukemia cells as NK-sensitive cells. Naringenin improved NK cell lysis activity at the lowest tested concentration (5.4 $\mu\text{g/ml}$). In contrast, the thermally processed naringenin presented the best activity at the highest tested concentrations (21.6 $\mu\text{g/ml}$). Our findings are in accordance with a recent

study conducted by Kim and Lee (2015). Macrophages perform a central role in innate and adaptive immunity through the lysosomal pathway. Lysosomes can moderate the phenotype/function of innate immune cells and can restrain the localization of internalized material (Bright et al. 2005; Luzio et al. 2007; Watts 2012). In addition, they internalize extracellular elements by endocytic or phagocytic mechanisms that lead to the formation of endolysosomal hybrids (resulting from fusions between late endosomes and lysosomes), which facilitates the exchange of intra-organelle contents. This process renders the internalized molecules disposed to degradation by the lysosomal hydrolases (Bright et al. 2005; Luzio et al. 2007). Among the enzyme secreted in this way, we found the acid phosphatase which gives a yellow color when reacting with PNPP (Alvarado et al. 2015). The tested molecules revealed inhibiting effects against the cellular lysosomal enzyme activity, suggesting that the unaffected and treated naringenins prevent the development of autoimmune responses (Alvarado et al. 2015). These results aside, macrophage phagocytosis is attended by the release of free radicals and other reactive nitrogen species (RNS, the latter comprising nitric oxide) involved in pathogen destroying (Manosroi et al. 2005). These species are also involved in many biological approaches (Xu et al. 2002). The study here showed that flavanones present an important inhibition of NO production in macrophages stimulated with LPS. This accentuates the anti-inflammatory role of native and processed naringenins and accords with other researchers who showed the immunomodulatory effect of NG (Bodet et al. 2008; Lopez-Posadas et al. 2008; Park et al. 2012; Yilma et al. 2013). On the other hand, the oxidation of DCFH-DA by peroxy radicals was significantly inhibited by NG in macrophages and by hNG in splenocytes. As mentioned in the literature review, NG proves an important antioxidant activity during the reaction with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) (González and Nazareno 2011). Besides, naringenin displays a strong antioxidant activity in vivo in different disease conditions. It is able to attenuate the oxidative damage induced by acetic acid and improve antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities (Al-Rejaie et al. 2013; Wang et al. 2012). This ability to trap free radicals may depend on the presence of hydroxyls on the A and B rings (5 and 4'-OH) (Jabbari and Jabbari 2016). The thermally processed naringenin has decreased the antioxidant activity on macrophages compared to the native molecule. Similar reports showed that thermal treatment decreases the antioxidant activity of phytochemical compounds such as rutin, quercetin, and chlorogenic acid (Buchner et al. 2006; Murakami et al. 2004).

Our results indicated that according to the target cells, some decomposition products preserve radical scavenging activity or enhance it, in splenocytes. The slight difference between the effects of native and heated naringenins on the

immunomodulatory system may be ascribed to the stability of NG. Thus, heat processing of food in the industrial chain does not destroy the characteristics or reduce the qualities of the phytochemicals present in nutrients but rather improves their nutritional and/or therapeutically values.

Conclusion

This study enhances our understanding of the role of naringenin as an immunomodulatory molecule that stimulates T cells and protects an organism by activating NK cytotoxicity cells. It has demonstrated, for the first time, that native flavanone induces B cell proliferation. Moreover, heat-treated naringenin enhances significantly the cellular antioxidant activity in splenocytes, stimulates the cytotoxic activity of NK cells, and downregulates the cytotoxicity of T cells. At the same time, heat treatment maintains the anti-inflammatory potency of naringenin. The slight difference with previous findings may be explained by the high stability of NG after heat treatment.

Acknowledgments The authors acknowledge the “Ministère Tunisien de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique” for its support.

Compliance with ethical standards

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

References

- Alexandrescu DT, Riordan NH, Ichim TE, Kauffman CL, Kabigting F, Dutton CT, Dasanu CA (2011) On the missing link between inflammation and cancer. *Dermatol Online J* 17:10
- Al-Rejaie SS, Abuhashish HM, Al-Enazi MM, Al-Assaf AH, Parmar MY, Ahmed MM (2013) Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *World J Gastroenterol* 19: 5633–5644. doi:10.3748/wjg.v19.i34.5633
- Alvarado R, O’Brien B, Tanaka A, Dalton JP, Donnelly S (2015) A parasitic helminth-derived peptide that targets the macrophage lysosome is a novel therapeutic option for autoimmune disease. *Immunobiology* 220:262–269. doi:10.1016/j.imbio.2014.11.008
- Ashraf MT, Khan RH (2003) Mitogenic lectins. *Med Sci Monit* 9: RA265–RA269
- Battella S, Cox MC, Santoni A, Palmieri G (2015) Natural killer (NK) cells and anti-tumor therapeutic mAb: unexplored interactions. *J Leukoc Biol*. doi:10.1189/jlb.5VMR0415-141R
- Baur JA, Sinclair DA (2008) What is xenohormesis? *Am J Pharmacol Toxicol* 3:152–159. doi:10.3844/ajptsp.2008.152.159
- Bhattacharya S, Rasmussen MK, Christensen LP, Young JF, Kristiansen K, Oksbjerg N (2014) Naringenin and falcariinol stimulate glucose uptake and TBC1D1 phosphorylation in porcine myotube cultures. *J Biochem Pharmacol Res* 2:91–98

- Bodet C, La VD, Epifano F, Grenier D (2008) Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. *J Periodontol Res* 43:400–407. doi:10.1111/j.1600-0765.2007.01055.x
- Bright NA, Gratian MJ, Luzio JP (2005) Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr Biol* 15:360–365. doi:10.1016/j.cub.2005.01.049
- Buchner N, Krumbein A, Rohn S, Kroh LW (2006) Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:3229–3235. doi:10.1002/rcm.2720
- Cavia-Saiz M, Busto MD, Pilar-Izquierdo MC, Ortega N, Perez-Mateos M, Muniz P (2010) Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J Sci Food Agric* 90:1238–1244. doi:10.1002/jsfa.3959
- Du G, Jin L, Han X, Song Z, Zhang H, Liang W (2009) Naringenin: a potential immunomodulator for inhibiting lung fibrosis and metastasis. *Cancer Res* 69:3205–3212. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3393
- Fang F, Tang Y, Gao Z, Xu Q (2010) A novel regulatory mechanism of naringenin through inhibition of T lymphocyte function in contact hypersensitivity suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 397:163–169. doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.065
- Franks AL, Slansky JE (2012) Multiple associations between a broad spectrum of autoimmune diseases, chronic inflammatory diseases and cancer. *Anticancer Res* 32:1119–1136
- González EA, Nazareno MA (2011) Antiradical action of flavonoid–ascorbate mixtures. *LWT-Food Sci Technol* 44:558–564
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140:883–899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025
- Hermenean A, Ardelean A, Stan M, Herman H, Mihali C-V, Costache M, Dinischiotu A (2013) Protective effects of naringenin on carbon tetrachloride-induced acute nephrotoxicity in mouse kidney. *Chemico-Biol Interact* 205:138–147
- Hogan T, Kadolsky U, Tung S, Seddon B, Yates A (2014) Spatial heterogeneity and peptide availability determine CTL killing efficiency in vivo. *PLoS Comput Biol* 10:e1003805. doi:10.1371/journal.pcbi.1003805
- Hooper PL, Hooper PL, Tytell M, Vigh L (2010) Xenohormesis: health benefits from an eon of plant stress response evolution. *Cell Stress Chaperones* 15:761–770. doi:10.1007/s12192-010-0206-x
- Howitz KT, Sinclair DA (2008) Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species. *Cell* 133:387–391. doi:10.1016/j.cell.2008.04.019
- Jabbari M, Jabbari A (2016) Antioxidant potential and DPPH radical scavenging kinetics of water-insoluble flavonoid naringenin in aqueous solution of micelles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 489:392–399. doi:10.1016/j.colsurfa.2015.11.022
- Kara S et al. (2014) Protective effect of hesperetin and naringenin against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced retinal injury in rats. *Sci World J*, 2014
- Kilani-Jaziri S, Mustapha N, Mokdad-Bzeouich I, El Gueder D, Ghedira K, Ghedira-Chekir L (2015) Flavones induce immunomodulatory and anti-inflammatory effects by activating cellular anti-oxidant activity: a structure-activity relationship study. *Tumour Biol*. doi:10.1007/s13277-015-4541-5
- Kim JH, Lee JK (2015) Naringenin enhances NK cell lysis activity by increasing the expression of NKG2D ligands on Burkitt's lymphoma cells. *Arch Pharm Res*. doi:10.1007/s12272-015-0624-5
- Knežević T, Petlevski R (2014) Antioxidative effect of naringenin on the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in HepG2 cells under hyperglycaemic conditions. *Biochemia Medica* 24
- Krifa M, Bouhlel I, Ghedira-Chekir L, Ghedira K (2013) Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall. *J Ethnopharmacol* 146:243–249. doi:10.1016/j.jep.2012.12.038
- Li Y-R, Chen D-Y, Chu C-L, Li S, Chen Y-K, Wu C-L, Lin C-C (2015) Naringenin inhibits dendritic cell maturation and has therapeutic effects in a murine model of collagen-induced arthritis. *J Nutr Biochem* 26:1467–78. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.07.016
- Limem I, Harizi H, Ghedira K, Chekir-Ghedira L (2011) Leaf extracts from *Phlomis crinita* Cav. subs. *mauritanica* Munby affect immune cell functions in vitro. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33:309–314. doi:10.3109/08923973.2010.504926
- Lin E-J, Zhang X, Wang D-Y, Hong S-Z, Li L-Y (2014) Naringenin modulates the metastasis of human prostate cancer cells by down regulating the matrix metalloproteinases-2/-9 via ROS/ERK1/2 pathways. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 9:419–427
- Lopez-Posadas R, Ballester I, Abadia-Molina AC, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, Sanchez de Medina F (2008) Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. *Biochem Pharmacol* 76:495–506. doi:10.1016/j.bcp.2008.06.001
- Lulu SS, Thabitha A, Vino S, Priya AM, Rout M (2015) Naringenin and quercetin—potential anti-HCV agents for NS2 protease targets. *Nat Prod Res* 30:464–8. doi:10.1080/14786419.2015.1020490
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:622–632. doi:10.1038/nrm2217
- Manosroi A, Saraphanchotiwithaya A, Manosroi J (2003) Immunomodulatory activities of *Clausena excavata* Burm. f. wood extracts. *J Ethnopharmacol* 89:155–160
- Manosroi A, Saraphanchotiwithaya A, Manosroi J (2005) In vitro immunomodulatory effect of *Pouteria cambodiana* (Pierre ex Dubard) Baehni extract. *J Ethnopharmacol* 101:90–94. doi:10.1016/j.jep.2005.03.031
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135–145. doi:10.1038/35100529
- Meng S, Wu Y, Hu X, Zhang H, Li C (2015) Naringenin may block RSV-induced mucous hypersecretion in A549 cell via JNK/AP-1 signaling pathway. *Zhonghua er ke za zhi (Chin J Pediatr)* 53:182–186
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
- Murakami M, Yamaguchi T, Takamura H, Atoba T (2004) Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *J Food Sci* 69:FCT7–FCT10
- Mustapha N, Mokdad-Bzeouich I, Sassi A, Abed B, Ghedira K, Hennebelle T, Chekir-Ghedira L (2015) Immunomodulatory potencies of isolated compounds from *Crataegus azarolus* through their antioxidant activities. *Tumour Biol*. doi:10.1007/s13277-015-4517-5
- Ng'uni T, Mothlalamme T, Daniels R, Klaasen J, Fielding BC (2015) Additive antibacterial activity of naringenin and antibiotic combinations against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*
- Orallo F, Camina M, Alvarez E, Basaran H, Lugnier C (2005) Implication of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition in the vasorelaxant activity of the citrus-fruits flavonoid (+/-)-naringenin. *Planta Med* 71:99–107. doi:10.1055/s-2005-837774
- Park HY, Kim GY, Choi YH (2012) Naringenin attenuates the release of pro-inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by inactivating nuclear factor-kappaB and inhibiting mitogen-activated protein kinases. *Int J Mol Med* 30:204–210. doi:10.3892/ijmm.2012.979
- Priscilla DH, Roy D, Suresh A, Kumar V, Thirumurugan K (2014) Naringenin inhibits alpha-glucosidase activity: a promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 210:77–85. doi:10.1016/j.cbi.2013.12.014
- Raza SS et al (2013) Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF-kB signaling pathway in

- experimental stroke. *Neuroscience* 230:157–171. doi:[10.1016/j.neuroscience.2012.10.041](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.041)
- Regoes RR, Barber DL, Ahmed R, Antia R (2007) Estimation of the rate of killing by cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1599–1603. doi:[10.1073/pnas.0508830104](https://doi.org/10.1073/pnas.0508830104)
- Ribeiro IA, Ribeiro MHL (2008) Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control* 19:432–438. doi:[10.1016/j.foodcont.2007.05.007](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.05.007)
- Rohn S, Buchner N, Driemel G, Rauser M, Kroh LW (2007) Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *J Agric Food Chem* 55:1568–1573. doi:[10.1021/jf063221i](https://doi.org/10.1021/jf063221i)
- Sansone P, Bromberg J (2011) Environment, inflammation, and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 21:80–85. doi:[10.1016/j.gde.2010.11.001](https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.11.001)
- Sarang I, Ghosh D, Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK (2006) Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *Int Immunopharmacol* 6:1287–1297. doi:[10.1016/j.intimp.2006.04.002](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.04.002)
- Silva LC, David JM, Borges Rdos S, Ferreira SL, David JP, Dos Reis PS, Bruns RE (2014) Determination of flavanones in orange juices obtained from different sources by HPLC/DAD. *J Anal Methods Chem* 2014:296838. doi:[10.1155/2014/296838](https://doi.org/10.1155/2014/296838)
- Vallverdu-Queralt A, Odriozola-Serrano I, Oms-Oliu G, Lamuela-Raventos RM, Elez-Martinez P, Martin-Belloso O (2012) Changes in the polyphenol profile of tomato juices processed by pulsed electric fields. *J Agric Food Chem* 60:9667–9672. doi:[10.1021/jf302791k](https://doi.org/10.1021/jf302791k)
- Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L (2012) Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 12:239–252. doi:[10.1038/nri3174](https://doi.org/10.1038/nri3174)
- Wang J, Yang Z, Lin L, Zhao Z, Liu Z, Liu X (2012) Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. *Biol Trace Elem Res* 146:354–359. doi:[10.1007/s12011-011-9268-6](https://doi.org/10.1007/s12011-011-9268-6)
- Watts C (2012) The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system. *Biochim Biophys Acta* 1824:14–21. doi:[10.1016/j.bbapap.2011.07.006](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.07.006)
- Wolfe KL, Liu RH (2007) Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 55:8896–8907. doi:[10.1021/jf0715166](https://doi.org/10.1021/jf0715166)
- Wu LH et al (2015) Naringenin suppresses neuroinflammatory responses through inducing suppressor of cytokine signaling 3 expression. *Mol Neurobiol*. doi:[10.1007/s12035-014-9042-9](https://doi.org/10.1007/s12035-014-9042-9)
- Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG (2002) The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 12:311–320. doi:[10.1038/sj.cr.7290133](https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290133)
- Yilma AN, Singh SR, Morici L, Dennis VA (2013) Flavonoid naringenin: a potential immunomodulator for *Chlamydia trachomatis* inflammation. *Mediators Inflamm* 2013:102457. doi:[10.1155/2013/102457](https://doi.org/10.1155/2013/102457)

Annexe 3

Article soumis pour publication

**(Effect of the process, temperature, light and oxygen on naringin
extraction and the evolution of its antioxidant activity)**



Article

Effect of the process, temperature, light and oxygen on naringin extraction and the evolution of its antioxidant activity

Irina Ioannou ^{1*}, Nouha M'hiri ^{1,2}, Hind Chaaban ¹, Nourhene Mihoubi Boudhrioua ² and Mohamed Ghoul ¹

¹ Lorraine University – Laboratory reactions and process engineering (LRGP)
2 avenue de la Forêt de Haye – BP 20163 54505 VANDOEUVRE CEDEX France.

nouha.mhiri@univ-lorraine.fr ; hind.chaaban@univ-lorraine.fr; mohamed.ghoul@univ-lorraine.fr

² UR11ES44, Ecophysiologie et Procédés Agroalimentaires, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet, Univ. De la Manouba, BP-66, 2020 Ariana-Tunis, Tunisie. Nourhene.boudhrioua@gmail.com

* Correspondence: irina.ioannou@univ-lorraine.fr ; Tel.: +33-383-595-814

Academic Editor: name

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Citrus co-products are rich in flavonones among them naringin. This compound exhibits several biological activities. These properties are mainly due to its antioxidant activity. The purpose of this work is in one hand to compare five technics of extraction conducting under different operating conditions (conventional solvent extraction, high pressure extraction, microwave assisted extraction, ultrasound assisted extraction and supercritical CO₂ extraction) and in the other hand, to analyze the effects of temperature, light and oxygen on naringin degradation and on the evolution of its antioxidant activity. The results obtained showed that the ultrasound assisted extraction (powers between 100 and 200 W) leads to the highest naringin content and the thermal degradation of naringin occurs only for higher temperatures above 100°C. Moreover, the naringin appears to be sensitive to an exposure to visible light (16.5 klux) while the presence of an oxygen even higher than 85% don't affect its stability. The antioxidant activity of naringin is significantly affected by the light and high temperature. The effect of the oxygen is less pronounced due to the lack of the enone structure and a hydroxyl group in position 3.

Keywords: extraction method; naringin; antioxidant activity; optimization; flavonoids; orange peel

1. Introduction

Nowadays, it was recognized that a diet with foods rich in flavonoids leads to a general well-being of consumers. This observation is attributed to the antioxidant activity of flavonoids which contributes to the reduction of specific diseases [1]. Among flavonoids, flavanones correspond to a group of flavonoids whose structure is defined according to the common skeleton of flavonoids without a double bond in position C2-C3 (enone structure) and the groupment OH in position 3 is missing (figure 1). Many studies showed that flavanones are biologically active to contribute to the prevention of cardiovascular diseases or cancer [2]. Moreover, flavanones have antihypertensive, lipid-lowering, insulin-sensitizing, antioxidative, and anti-inflammatory properties [3]. The class of flavanones is specific to citrus products (fruit, juice). They largely contribute to the total daily flavonoid intake. Among flavanones found in Citrus co-products, naringin is the molecule that has

the most interesting biologic activities. In fact, naringin can reduce the level of cholesterol in the plasma, reduce the risk of atherosclerosis, protect the level of vitamin E in the plasma, enhance flavors for sweets, drinks and bakery products and stabilize oils (antioxidant and antimutagenic activity) [4-6]. Naringin is found in the white spongy portion of citrus peel. Its content varies from 0.65 mg/g in mandarin peel to 14.40 mg/g in grapefruit peel [4,7].

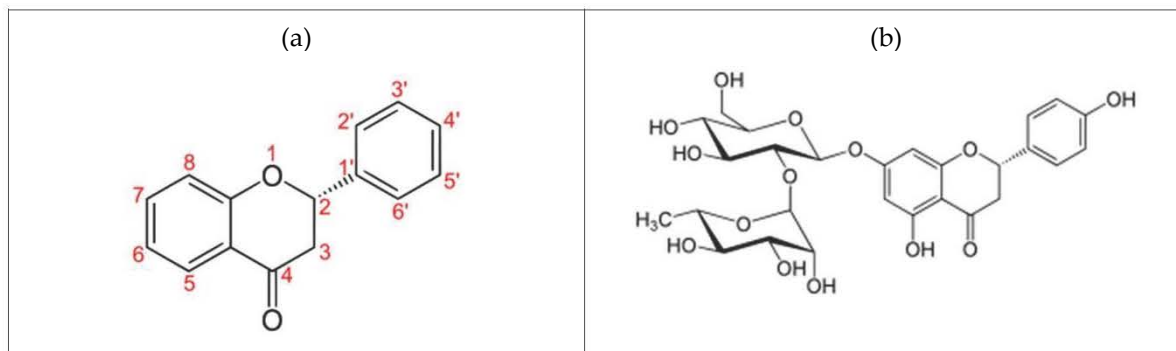


Figure 1. (a) Common skeleton of flavonones and (b) naringin structure

Citrus is the most important fruit crops in the world with a production estimated at 89 million tons in 2014 [8]. Approximately 26% of Citrus fruits are industrially processed into juice. The amount of industrial Citrus coproducts is estimated at 15×10^6 tons and it consists essentially in seeds, peels and pulp residue [9, 10]. The valorization of these co-products is a relevant solution to avoid the increase in waste from the Citrus industry. Indeed, Citrus co-products are rich in bioactive molecules (pigments, fibers, essential oils, flavonoids) which can constitute a high added value for the industrialists. The limiting step to the use of these molecules is their extraction from the raw material. Thus, many studies dealt with the development or the optimization of extraction methods of flavonoids from Citrus peels [11]. However, the optimization of these techniques concerns only the yield of total flavonoids and do not take the selectivity of the process into account. Indeed, flavonoids are sensitive to their environment and this sensitivity is more or less intense according to the flavonoid structure. High temperature, presence of light or oxygen can lead to severe degradations of flavonoids and a loss of their properties [12]. Thus, the development or the optimization of extraction processes must take the effects of temperature, light and oxygen on flavonoid degradation into account. The objectives of this paper is to determine the extraction process and its operating conditions which are the most selective for naringine and to study the naringine stability to the heat, light and oxygen. For this, in a first part, conventional extraction by solvent, microwave assisted extraction, ultrasound assisted extraction, supercritical CO_2 extraction and high pressure extraction were compared and optimized to obtain extracts with high contents of naringine. In a second part, we studied the effects of temperature, light and oxygen on the degradation kinetics of naringin and the evolution of its antioxidant activity.

2. Materials and Methods

2.1. Chemical and reagents

All chemicals were of analytical or HPLC grade purity. Naringin and 2,2'-azimobis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). High-purity water was produced in the laboratory using an Alpha-Q system (Millipore,

MA). Trolox and potassium persulfate were purchased from Fluka (Switzerland). Methanol and ethanol were obtained from Carlo Erba-SDS (France).

2.2. Extraction methods of naringin

Peels from fresh orange (*Citrus sinensis*) of Maltese variety were dehydrated using a freeze dryer (CHRIST Alpha 1-2 LD, France) for 72 h (at -50°C and 0.001 mbar) and then finely ground using a coffee grinder (Moulinex→, France) to achieve a standard size of particles of ~ 0.315 mm. Naringin was extracted by five different methods: conventional extraction by solvent (CSE), ultrasound assisted extraction (UAE), microwave assisted extraction (MAE), supercritical CO₂ extraction (SCE) and high pressure extraction (HPE). Operating conditions of each extraction method are given in table 1.

Table 1. Operating conditions of the five extraction methods

	CSE	UAE	MAE	SCE	HPE
	Five grams of orange peel powder were extracted with 50 ml of 80% ethanol.				
Apparatus		ultrasound sonicator (VibraCell 75115, Bioblock-Fisher, France)	A laboratory scale microwave extraction apparatus (Multiwave 3000, Austria)	a pilot scale extractor (ENSIC, LRGP, Nancy, France)	3L reactor unit (ACB Pressure Systems, Nantes, France)
Stirrer	200 rpm	magnetic			
	darkness	darkness	darkness	darkness	darkness
Time	30 min	30 min	180 s	30 min	30 min
Temperature	35°C	35°C	Depend on power	[35-80]°C	35°C
Optimization parameters		[100-200] W	[100-400] W	[10-22] MPa	[0.1;50;100] MPa
				15 g/min CO ₂ Ethanol as modifier	

The extracts obtained were centrifuged at 8000g for 10 min and the supernatants were filtered through a 0.2 µm solvent filter. The residues were further extracted two times with 50 ml of the same solvent under the same extraction conditions. Combinations of the three extracts were collected and stored at 4°C.

2.3. Effect of temperature, light and oxygen on naringin solutions

Aqueous solutions of naringin (0.29 mM) were prepared. Naringin was solubilized in the dark at 25°C until maximum solubilization was achieved.

2.3.1. Thermal treatment

Thermal treatment was conducted in an oil-based bath (Hubert, W8518D). After filtration (0.20 μm), 10 mL samples of naringin solutions were put into screw-cap pyrex tubes and heated from 30 to 130°C for a total duration of 120 min. Samples were taken every 15 min and cooled in an ice bath to 30°C. The residual flavonoid content and the antioxidant activity of the solution were measured. Kinetic parameters of the naringin degradation during heat treatment were calculated. Kinetic was modeled by a first order reaction (1).

$$\ln(C_t/C_0) = -kt \quad (1)$$

where C_0 is the initial flavonoid content (mg/L) and C_t is the flavonoid content (mg/L) after t minutes of heating at a given temperature, k is the reaction rate constant (min^{-1}).

The increase and decrease of temperature during heating were very rapid so we can consider that we are in isothermal conditions. Thus, the temperature dependence of the degradation rate constants can be modeled using the Arrhenius law (2).

$$\ln k = \ln k_0 - (E_a / RT) \quad (2)$$

with E_a activation energy (kJ/mol), R ideal gas constant ($8.314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) and T the heating temperature (K).

2.3.2. Storage under light and oxygen

A climatic cell (Climacell, Thermofisher) was used to mimic the visible light during the study. After filtration (0.2 μm), 10-mL samples of naringin solutions were put in screw-cap pyrex tubes. Two sets were prepared, one with nitrogen bubbling of 2 minutes which leads to an oxygen amount of 15% and the other one without bubbling, with an oxygen amount of 85%. Temperature of the climatic cell is set at 25°C. Model solutions were exposed to 0% light (darkness) and 100% light. An intensity of 100% is equivalent to an exposure at 16.5 klux. Each day one sample per set is removed for 15 days. The residual flavonoid content and the antioxidant activity of the solution were measured.

2.4. Analysis of naringin by HPLC

Naringin content was analyzed in an Elite Lachrom HPLC system (VWR HITACHI) which consisted of a quaternary pump (L-2130), an autosampler (L-2200) and a diode-array detector (L-2455). The analyses were carried out on a C18 (150x4.6 mm) column (Grace). The elution system consists in water (A) + methanol (B). Samples were eluted at a flow rate of 1 mL/min with a gradient of 95% water (A) at time 0 up to 100% (B) at 10 min and finally 95%(A) at 20 min before the end of the program. The total duration was 30 min. The injection volume was of 50 μL and the column temperature was set at 50°C. The detection was performed simultaneously at 200, 280, 254 and 350 nm. Naringin content was expressed as a percentage compared to the initial content.

2.5. Antioxidant assay (ABTS)

Antioxidant activity was determined every 15 min during the thermal treatment by the ABTS method. Assays were performed using a spectrofluorimeter SAFAS (Xenius) equipped with a 96-well polystyrene plate.

Scavenging free radical potentials were tested in an aqueous solution of ABTS^{•+} according to the method described by Re *et al.* [13] with modifications for use in microplates. The percentage of inhibition was calculated by the equation (3).

$$(IP\%) = 100 * (A_c - A_s) / A_c \quad (3)$$

where A_c and A_s are the absorbance of the control and of the test sample, respectively.

Results were expressed as TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) values as millimoles of Trolox. From this measurement, we defined Δ TEAC. It corresponds to the difference between the total TEAC of the solution and the TEAC due to the residual flavonoid in solution.

2.6. Statistical analysis

Each experiment was performed using three replicates. Average and standard deviations were calculated. Moreover, an ANOVA followed by a Tukey test (freeware R© (2.11.1)) were performed to evaluate significant differences on naringin content after extraction. Differences are significant for $p < 0.5$.

3. Results

3.1. Comparison of different extraction methods of naringin

The methods used to extract naringin are the following: (i) high pressure extraction in which three different pressures (0.1, 50 and 100 MPa) were applied, (ii) microwave assisted extraction in which microwave powers between 100 and 400 W were tested, (iii) ultrasonic assisted extraction in which four ultrasound powers between 100 and 200 W were used and (iv) supercritical CO₂ extraction in which different extraction temperature (35-80°C) and pressure (10-22 MPa) were varied. The extraction by conventional solvent was used as control. All the extractions were realized in the dark. The naringin released was evaluated for each extraction.

The results presented on figure 2 indicate that the highest level of extraction was reached when ultrasound assisted extraction is applied. Indeed, at a power of 100 W, 0.983 g/kg \pm 0.175 of naringin was released instead 0.420 \pm 0.170 for the control. The ultrasound power exhibits a low effect on the naringin extraction. The high performance of ultrasonic process can be explained by the fact that this technology destroys cell walls and allows the release of naringin in greater quantity.

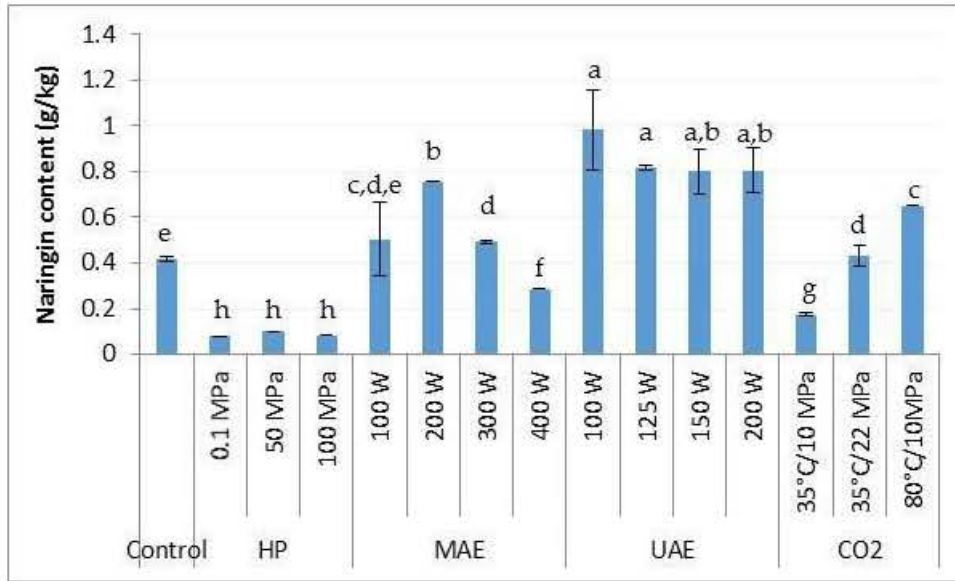


Figure 2. Naringin content of the extracts obtained by different methods with different operating conditions. Contents with the same letter are not statistically significant according to Tukey's test at significance level $p < 0.05$.

Concerning the microwave assisted extraction (powers 200 and 300 W), the naringin content in liquid phase is superior to the control due to the increase of the temperature, therefore, to increase of the mass transfer. However, a high power (400 W) provokes naringin degradation. In fact, in these conditions, the temperature rises to reach 108°C.

For the supercritical CO₂ extraction, the efficiency of this process is observed for a couple of pressure and temperature higher than 10 MPa and 35°C. However, the effect of temperature is more pronounced than the effect of the pressure. The increase of the temperature until 80°C gives a better content in naringin than an increase of the pressure to 22 MPa.

As it is indicated in figure 2, for high pressure extraction, the concentration of naringin remains below the control whatever the set point of the pressure applied. This finding can be explained by the fact that at high pressure, two mechanisms occur in parallel by means the release of naringine and its degradation [14].

3.2. Effect of a thermal treatment on naringin content and its antioxidant activity

The effect of the temperature on the degradation kinetics of naringin was investigated in a large domain between 30 and 130°C and during two hours. For each assay, residual naringin contents and antioxidant activities were determined.

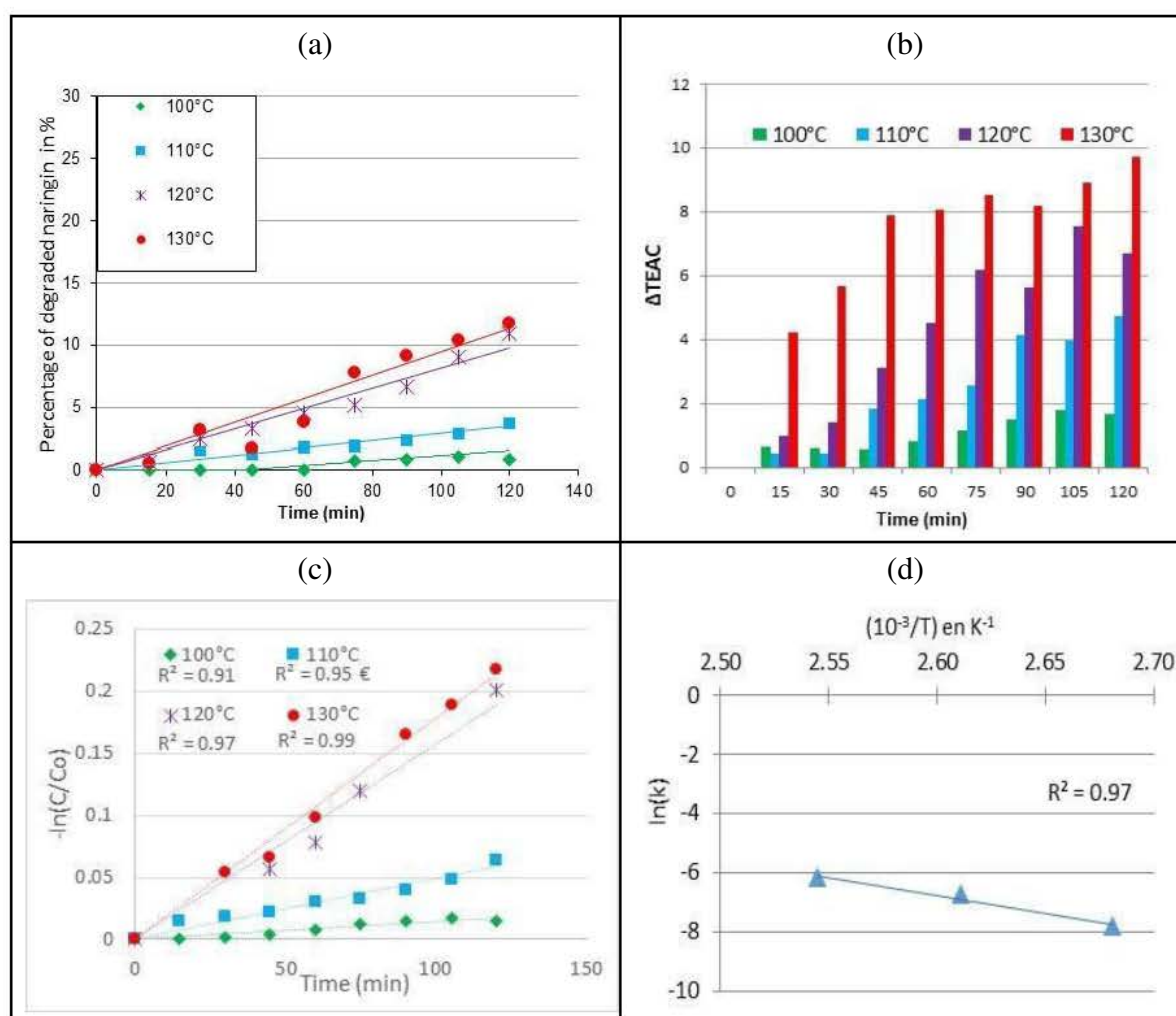


Figure 3. (a) Degradation kinetics of naringin during a thermal treatment (b) evolution of Δ TEAC of naringin during a thermal treatment (c) modeling of degradation kinetics by a first order equation (d) modeling of the temperature dependency by Arrhenius law.

As indicated in figure 3a, naringin shows a high thermal stability without any degradation for temperatures lower than 100°C. Less than 2%, 6%, 18 and 19 % were depleted respectively for the temperatures 100, 110, 120 and 130°C. Standard deviations are equal to 2 % and are not reported on the figure to not overload it.

Logarithm (C/C_0) was plotted versus heating time (figure 3c). Straight lines were obtained with determination coefficients superior to 0.9. Thus, naringin degradations follow a first order kinetic. Similar results are reported for the degradation of anthocyanins, flavonols, flavones and flavanols [15,16]. The calculated constant rates for the different temperatures are the following: 2.10^{-3} (100°C), 4.10^{-3} (110°C), 16.10^{-3} (120°C), $19.10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (130°C). These results showed that the naringin degradation increases with the intensity of the thermal treatment.

The Arrhenius model was used to take the temperature dependence into account (figure 3d). This model allows a good estimation of activation energy (100.6 kJ/mol) with an $R^2 = 0.97$. This value of activation energy is relatively high compared to the literature data. It can be explained by the particular naringin structure. Indeed, values of activation energy are in the interval 33-68.2 kJ/mol for aglycon flavonoids and in the interval 100.6-120 kJ/mol for glycosylated flavonoids [15]. The presence

of a glycosyl groupment increases the energy necessary to degrade the flavonoids. Glycosylated flavonoids like rutin has an activation energy higher (107.3 kJ/mol) than naringin because of the presence of a double bond in position C2-C3.

The figure 3b shows the evolution of Δ TEAC versus the heating time. It appears that high is the temperature high is the Δ TEAC. Standard deviations on Δ TEAC are inferior to 1, so we can conclude to a significant increase of Δ TEAC during the thermal treatment. After two hours of heating, a Δ TEAC of 2 is reached at a temperature of 100°C whereas it reaches 10 at a temperature of 130°C. The results obtained indicate that degradation products of naringin have an antioxidant activity or induce positive synergy effects that could be at the origin of the increase of Δ TEAC. Similar findings were reported when rutin samples were heated at 100°C during 300min. Despite low amount of residual rutin content in the samples, the solutions showed a significant antioxidant activity [17].

3.3. Effect of light and oxygen on naringin content and its antioxidant activity

A storage period at a temperature of 25°C was applied to naringin solutions under different operating conditions (light/darkness; high/low oxygen content). The results obtained are summarized in figure 4.

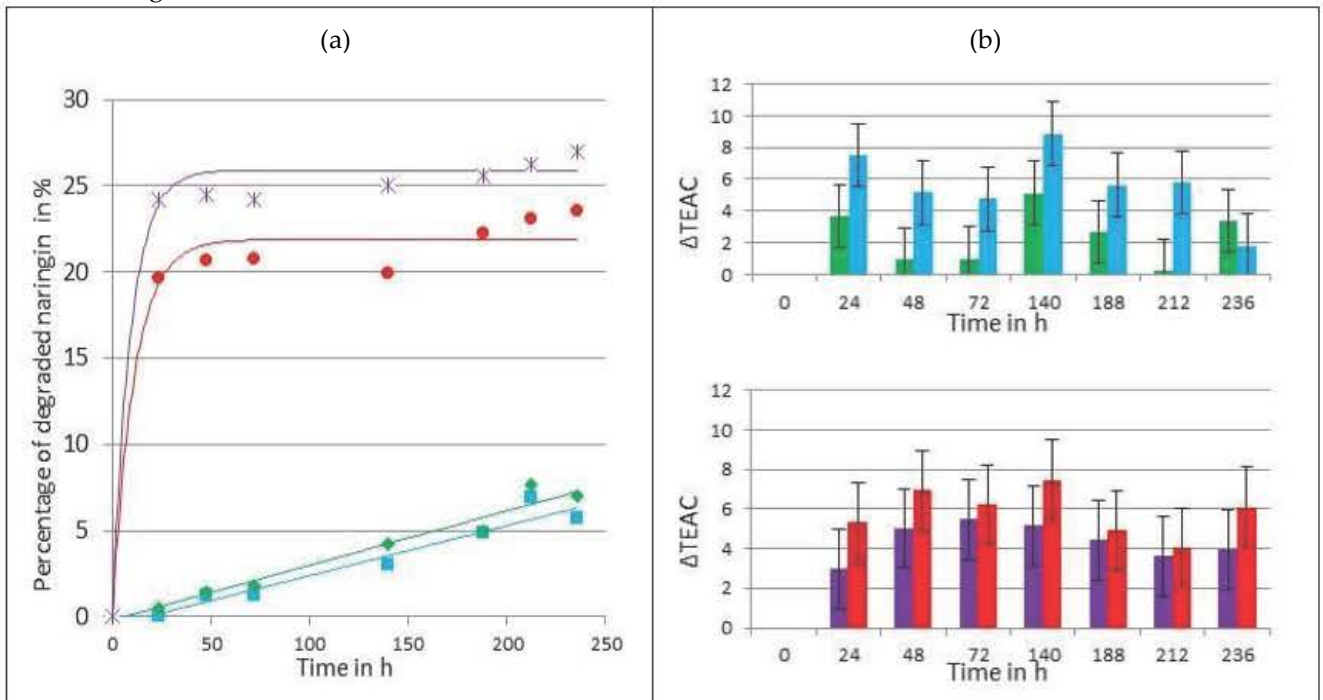


Figure 4. (a) Degradation kinetics of naringin versus the storage time and (b) Evolution of Δ TEAC of naringin solutions during the storage ■ dark (+O₂) ◆ dark (-O₂) ■ light (+O₂) ★ light (-O₂)

As it is indicated on figure 4a, naringin is more sensitive to a storage with a light exposure. Indeed in the darkness, less of 10% of naringin are lost whatever the oxygen content. With an exposure to 100% light, a rapid increase of the percentage of the naringine degraded was observed during the 48h, then the percentage of naringin degraded remains constant. These results indicate clearly that naringin is not stable over time even in a dark medium and at a low oxygen content. Similar data were mentioned by Dall'acqua *et al.* [18]. This high stability of naringin compared to other phenols could be attributed to its structure characterized by a lack of the enone structure and a hydroxyl in position 3. The high sensitivity of the phenols is attributed to two mechanisms. The first

one consists of an addition of the solvent to the molecule on the enone structure and the second one is an oxidation reaction on the hydroxyl group in position 3 [19].

As indicated on figure 4a, the degradation kinetics of naringin showed different profiles according to the operating conditions applied. In a darkness environment, the kinetics present straight lines whereas in presence of light, the kinetic shapes are rather exponential. These profiles were already observed for others flavonoids [20,21]. The difference observed between the profiles can be attributed to the fact that the thermodynamic equilibrium between the substrates and the formed products is not reached at the same time. Three parameters contribute to the level of the equilibrium: (i) the nature and the concentration of the initial substrate, (ii) the nature and the concentration of the formed products and (iii) the operating conditions. Moreover, the shift to reach the equilibrium can be accentuated by the fact that degradation products can also degrade themselves during the experiments.

The effect of the oxygen is not drastic. Only a few differences was observed between the degradation kinetics obtained with the two oxygen amounts. However, this difference is not significant because standard deviations are equal to 2%. Contradictory results were obtained for the sensitivity of flavonoids to oxygen. Several authors indicated that flavonoids are sensitive to oxygen with many degradation products [22, 23]. However, Tournaire *et al.* [24] underlined that flavonoid reactivity to oxygen depends only on the structure of the central ring. Thus, they determined that flavanones and flavanes are chemically stable in the presence of oxygen while flavones and flavonols are more sensitive. These findings are in accordance to our results and explain that oxygen have no effect on the naringin degradation.

Figure 4b presents the evolution of Δ TEAC during the storage under different operating conditions. The statistical analysis realized on three replicates indicates that the standard deviation on Δ TEAC is equal to 2. Thus, the Δ TEAC calculated during a storage in the dark whatever the oxygen content can be considered as constant. Contrariwise, the Δ TEAC calculated during a storage with light exposure increases during the first 48 h and then remains constant. Evolution of Δ TEAC can be correlated to the degradation kinetics of naringin. This result confirms that the evolution of the antioxidant activity during storage is linked to the apparition of the degradation products.

4. Discussion

The four extraction methods used in this work are all solvent extractions, but microwave and ultrasonic assisted extraction use physical accelerators. The use of accelerators for solvent extraction is interesting because it makes it possible to shorten the extraction time (with microwave) and increase the naringin content with ultrasounds or microwaves (200 and 300 W). Indeed, microwaves act by increasing the temperature and intracellular pressure. The walls of the cells are thus more fragile and more porous to the extraction solvent. Thus, it allows the increasing of the flavonoid extraction. Ultrasounds generate ultrasonic pressure waves that propagate in the solvent. A phenomenon of acoustic cavitation is then created which causes the formation of bubbles. These burst upon contact with the cells and cause the rupture of the cell walls, which facilitates the release of naringin. Extraction with supercritical CO₂ is also a solvent extraction but its peculiarity is the use of fluids in the critical state. Due to the critical properties of CO₂, this process makes it possible to increase the mass transfer and the extraction of the molecules. However, extraction with supercritical CO₂ allows the privileged extraction of the apolar molecules. Naringin, is a polar flavonoid, so the extraction temperature or pressure must be increased to obtain a high naringin content. However, this increase can cause the degradation of naringin if they are too high. During the naringin extraction, two reactions occur simultaneously with increasing extraction temperature and/or

pressure. These two reactions are: (i) an increase of the naringin released and (ii) a degradation of naringin. When the rate of the first reaction is greater than that of the second, an increase in the naringin content is observed whereas, when the speed of the second reaction is greater than the speed of the first reaction, a decrease in the naringin content is observed.

The study of the effects of temperature, light and oxygen, showed that naringin does not degrade with an oxygen content of 85% and for temperatures lower than 100°C. However, to preserve naringin, exposure to light must be avoided. These results are coherent with those obtained in the comparison of the extraction methods of naringin. Indeed, an extraction temperature of 80°C leads to an increase of the naringin content since naringin is not affected by temperatures under 100°C. However, when a temperature of 108°C is applied (microwave power of 400 W), we observed a decrease of the naringin content certainly due to a degradation of the naringin.

Results about the evolution of the antioxidant activity of treated naringin solutions showed that degradation products of naringin have an antioxidant activity or lead to positive synergies with naringin. More the naringin is degraded more the antioxidant activity increases. These results underline the importance to identify the structure of the degradation products.

References

1. Tomás-Barberán, F. A.; Ferreres, F.; Gil, M. I. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. In *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman; Elsevier Science; pp. 739-795.
2. Benavente-Garcia, O.; Castillo, J. Update on uses and properties of Citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agr. Food Chem.* 2008, 56 (15), 6185-6205. DOI: 10.1021/jf8006568.
3. Chanet, A.; Milenkovic, D.; Manach, C. Citrus Flavanones: What Is Their Role in Cardiovascular Protection. *J. Agr. Food Chem.* 2012, 60(36), 8809-8822. DOI: 10.1021/jf300669.
4. Giannuzzo, A.N.; Boggetti, H.J.; Nazareno, M.A.; Mishima, H.T. Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of Citrus paradise. *Phytochem. Analysis* 2003, 14, 221-223. DOI: 10.1002/pca.7
5. Nogata, Y.; Ohta, H.; Yoza, K.; Berhow, M.; Hasegawa, S. High-performance liquid chromatographic determination of naturally occurring flavonoids in Citrus with a photodiode array detector. *J. Chromatograph. A.* 1994, 667, 59-66.
6. Zhang J. Flavonoids in Grapefruit and commercial Grapefruit juices: concentration, distribution and potential health benefits. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society, Florida, USA.* 120, 288-294.
7. Hayat, K.; Zhang, X.; Chen, H.; Xi, S.; Jia, C.; Zhong, F. Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Sep. Purif. Technol.* 2010, 73, 371-376. DOI: 10.1016/j.seppur.2010.04.026.
8. United States Department of Agriculture (USDA). Citrus: World Markets and Trade. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. July 2014.
9. Bocco, A.; Cuvelier, M.E.; Richard, H.; Berset, C. Antioxidant activity and phenolic composition of Citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46 (6), 2123-2129. DOI: 10.1021/jf9709562.
10. Marin, F.A.; Soler-Rivas, C.; Benavente-Garcio.; Castillo, J.; Perez-Alvarez, J.E. Byproducts from different Citrus processes as a source of customized functional fibers. *Food Chem.* 2007, 100, 736-741. DOI: 10.1155/2013/345415
11. M'hiri, N.; Ioannou, I.; Ghoul, M.; Mihoubi Boudhrioua, N. Extraction methods of citrus peel phenolic compounds. *Food Rev. Int.* 2014, 30, 265-290. DOI: 10.1080/87559129.2014.924139

12. Ioannou I.; Hafsa, I.; Ghoul, M. Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behavior. *J. Food. Eng.* 2012, 111, 208-217. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.02.006
13. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 1999, 26(9-10), 1231- 1237. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
14. Chemat, F.; Huma, Z.; Khan, M.K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 2011, 18, 813–835. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023
15. Chaaban H.; Ioannou, I.; Chebil, L.; Slimane, M.; Gerardin, C.; Paris, C.; Charbonnel, C.; Ghoul M. Effect of heat treatment on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *J. Food Process. Eng.* 2017. DOI: 10.1111/jfpp.13203.
16. Patras A.; Brunton N.P.; O'Donnell C. and Tiwari B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods: mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci. Tech.* 2010, 21, 3-11. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.07.004.
17. Buchner N.; Krumbein A.; Rhon S; Kroh L.W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Commun. Mass Sp.* 2006, 20, 3229–3235. DOI:10.1002/rcm.2720
18. Dall'Acqua, S; Miolo, G.; Innocenti, G.; Cafieri, S. The photodegradation of quercetin: relation to oxidation. *Molecules* 2012, 17, 8898-8907. DOI: 10.3390/molecules17088898.
19. Zhang, X.; Cardon, D.; Cabrera, J.L.; Laursen R. The role of glycosides in the light-stabilization of 3-hydroxyflavone (flavonol) dyes as revealed by HPLC. *Microchimica Acta*, 2010, 169, 327-334. DOI 10.1007/s00604-010-0361-x.
20. Chaaban H.; Ioannou I.; Gerardin, C; Charbonnel C.; Ghoul M. Effect of light and oxygen on the degradation of 6 flavonoids and the evolution of their antioxidant activity. *J. Photochem. Photobio A* 2017, 336:131-139.
21. Tommasini, S.; Calabrò, M.L.; Donato, P.; Raneri, D.; Guglielmo, G.; Ficarra, P.; Ficarra, R. Comparative photodegradation studies on 3-hydroxyflavone: influence of different media, pH and light sources. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2004, 35, 389-397. DOI:10.1016/S0731-7085(03)00586-7.
22. Ramešová, S.; Sokolová, R.; Degano, I.; Bulíčková, J.; Žabka, J.; Gál, M. On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402, 975–982. DOI: 10.1007/s00216-011-5504-3.
23. Zenkevich, I.G.; Eshchenko, A.Y.; Makarova, S.V.; Vitenberg, A.G.; Dobryakov, Y.G.; Utsal V.A. Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature. *Molecules*, 2007, 12, 654-672. DOI: 10.3390/12030654.
24. Tournaire, C.; Croux, S.; Maurette, M.-T. ; Beck, I. ; Hocquaux, M.; Braun, M.; Oliveros, E. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen quenching. *J. Photoch. Photobio. B*, 1993, 19, 205-215. DOI: 10.1016/1011-1344(93)87086-3.

Résumé de la thèse

Les objectifs de cette thèse sont d'une part d'étudier les effets d'un traitement thermique et de l'environnement physico-chimique sur la stabilité de 6 flavonoïdes de structure différente et sur l'évolution de leur activité anti-oxydante. Les conditions du traitement thermique ont été les suivantes : (i) chauffage dans des conditions isothermes durant 2h pour des températures allant de 30 à 130°C et (ii) chauffage dans des conditions non isothermes par microcalorimétrie (de 30 à 130°C, 4°C/ heure). Les flavonoïdes ont été solubilisés dans de l'eau. Nous avons constaté que les flavonoïdes glycosylés sont plus résistants que les flavonoïdes aglycones. Les énergies d'activation de dégradation calculées dépendent aussi de la structure du flavonoïde. Pour se dégrader, les flavonoïdes glycosylés ont besoin d'une énergie élevée par rapport à la forme aglycone. L'exposition à la lumière a été réalisée durant 15 jours avec et sans oxygène, le témoin de l'expérience étant un stockage à l'obscurité avec et sans oxygène. La dégradation des flavonoïdes est influencée par la présence de lumière et par la quantité d'oxygène. Les molécules ont une sensibilité différente en fonction de leur structure, le classement suivant est obtenu d'après : naringine, ériodictyol puis rutine, lutéoline, lutéoline 7-O-glucoside et enfin le mesquitol. En effet, la présence d'un groupe hydroxyle en position 3 et une double liaison C2-C3 diminue la stabilité des flavonoïdes. En outre, il a été observé que, malgré la dégradation totale de certains flavonoïdes par le traitement thermique et l'environnement physico-chimique, les solutions traitées conservent une activité anti-oxydante.

Titre de la thèse : Étude cinétique et modélisation des effets des traitements thermiques et de la lumière sur l'activité anti-oxydante des flavonoïdes et de leurs dérivés.

Mots-clefs : activité anti-oxydante, flavonoïdes, traitement thermique, modélisation, stabilité thermique, photostabilité, oxydation.

Summary of thesis

The objectives of this thesis are to study the effects of a heat treatment and the physicochemical environment on the stability of 6 flavonoids of different structure and on the evolution of their antioxidant activity. The heat treatment conditions were as follows: (i) heating under isothermal conditions for 2 h at temperatures ranging from 30 to 130 ° C and (ii) heating under non-isothermal conditions by microcalorimetry (30 to 130 ° C, 4 ° C / hour). The flavonoids were solubilized in water. We found that the glycosylated flavonoids are more resistant than the aglyconic flavonoids. The calculated degradation activation energies also depend on the structure of the flavonoid. To degrade, glycosylated flavonoids require high energy relative to the aglycone form. Exposure to light was carried out for 15 days with and without oxygen, the experimental control being a dark storage with and without oxygen. The degradation of flavonoids is influenced by the presence of light and by the amount of oxygen. The molecules have a different sensitivity according to their structure, the following classification is obtained according to: naringine, ériodictyol then rutin, luteolin, luteolin 7-O-glucoside and finally the mesquitol. Indeed, the presence of a hydroxyl group at position 3 and a C2-C3 double bond reduces the stability of the flavonoids. Furthermore, it has been observed that, despite the total degradation of certain flavonoids by the heat treatment and the physico-chemical environment, the treated solutions retain an antioxidant activity.

Title of thesis: Kinetic study and modeling of the effects of heat treatments and light on the antioxidant activity of flavonoids and their derivatives.

Keywords: antioxidant activity, flavonoid, heat processing, modelling, thermal stability, photostability, oxidation.