

# UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

*ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant*

Institut de Chimie Organique et Analytique

## THÈSE présentée par :

**Marine CHAMBAUD**

soutenue le : **6 décembre 2024**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie analytique - Phytochimie

## Développement de méthodes d'éco-extraction à l'eau et caractérisation phytochimique de plantes tinctoriales d'intérêt cosmétique

THÈSE dirigée par :  
**DESTANDAU Emilie**

Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :  
**MARTIN Patrick**  
**VIAN Maryline**

Professeur, Université d'Artois  
Professeur, Université d'Avignon

JURY :  
**CHAMPY Pierre**  
**BOUDESOCQUE-DELAYE Leslie**

Professeur, Université Paris-Saclay, Président du jury  
Professeur, Université de Tours



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Maryline Vian, directrice du Groupe de Recherche en Eco-Extraction des produits naturels (GREEN) de l'Université d'Avignon et Patrick Martin, responsable de l'équipe Valorisation des Agroressources en Molécules et Matériaux Innovants de l'Université d'Artois, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie aussi Leslie Boudesocque-Delaye, professeure à l'Université de Tours et Pierre Champy, professeur à l'université Paris-Saclay d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

A l'issue de ces trois années, je souhaite remercier les personnes qui m'ont permis de vivre cette expérience unique qu'est la thèse. En premier lieu, je remercie donc ma directrice de thèse, Emilie Destandau, pour m'avoir accompagnée tout au long de ces travaux. Je suis reconnaissante pour sa disponibilité et ses conseils, mais aussi pour l'autonomie et la liberté qu'elle m'a accordées pendant ma thèse. Je remercie aussi Terre de Couleur, et plus particulièrement Rémi Guyomarch, le président de l'entreprise et Christian Muchenbach, son directeur général, qui sont à l'origine de cette thèse CIFRE, mais aussi du projet global dans lequel elle s'inscrit. Je les remercie de m'avoir intégrée dans cette collaboration et pour la confiance qu'ils m'ont accordée pendant ces trois années.

De la même façon, je souhaite remercier les autres membres du projet Eau Photonisée et Innovations Cosmétiques. Je remercie Héloïse Seguin, formulatrice de Terre de Couleur, qui nous a présenté les produits de l'entreprise et leur formulation et qui s'est rendue disponible pour nos questions et nos sollicitations. Je remercie aussi Elian Lati, le fondateur de l'entreprise Bio-EC et Laurent Peno-Mazzarino, directeur d'étude chez Bio-EC, qui ont apporté leur expertise, leur esprit scientifique, mais aussi leur bonne humeur aux tables de réunion. Enfin, je remercie Louis Hennet et sa doctorante Ariane Fournier du laboratoire Interfaces, Confinement, Matériaux et Nanostructures qui m'ont accueillie plusieurs fois pour réaliser des analyses physico-chimiques et préparer des formulations. Je les remercie sincèrement pour ces parenthèses scientifiques complémentaires de ce que j'ai pu voir dans mon laboratoire. Je n'aurais pas pu souhaiter trouver un meilleur acolyte pour ce projet ni une meilleure amie avec qui tout partager qu'Ariane.

Je suis également particulièrement reconnaissante envers les membres du laboratoire qui m'ont distillé leurs connaissances et aidé sur les différentes techniques que j'ai pu utiliser voire découvrir pendant ma thèse. Alors dans un ordre plus ou moins chronologique, merci à Sandrine Zubrzycki et Laëtizia Fougère, les premières à m'avoir initiée sur les différents appareils, qui ont répondu à toutes mes questions avec patience et qui ont réglé tous les petits soucis que j'ai rencontrés, à Cyril Colas pour les analyses de spectrométrie de masse, mais surtout pour son aide sur le retraitement des données et pour toutes les longues discussions sur tout et rien qui m'ont changé les idées et beaucoup fait rire. Merci aussi à Pierre-Eric Campos et David Da Silva pour leur humour, leurs conseils avisés et leur point de

## REMERCIEMENTS

vue critique, mais toujours bienveillant sur les travaux présentés en réunions d'équipe. Je remercie aussi l'équipe du We Lab Cosmetic et notamment Emmanuelle Percheron, responsable de l'équipe et Adélaïde Theffo, ingénieure et formulatrice, de nous avoir permis d'utiliser leurs équipements et d'avoir accueilli et accompagné nos stagiaires pour certains travaux de formulation. Enfin, je remercie Benjamin Caux pour les analyses des huiles végétales et Clément De Saint Jores pour son aide sur les analyses GC et ailleurs (on se rappelle de l'intervention chirurgicale sur Papitachi) avec toujours son humour décalé, sa disponibilité et ses réponses à toutes mes questions les plus naïves (presque sans jugement).

Je retiendrai de l'ICOA l'esprit d'entente et la convivialité et j'emporte avec moi des souvenirs chaleureux de chacun. Je remercie les membres de l'ICOA et particulièrement de l'équipe analytique pour leur sympathie, pour les repas partagés, pour les conversations, pour les gâteaux et pour tout le reste. Je suis particulièrement reconnaissante envers les plantules, les filles du labo plante, pour les moments de travail en équipe, les souvenirs de congrès et le support mutuel, mais aussi pour les sorties, les pauses café et les calendriers de l'avent (notre meilleure tradition). Je suis reconnaissante envers Gaëlle, qui m'a accueillie dans l'équipe et initiée à son fonctionnement, Rym, qui m'a apporté son aide et son amitié lorsque j'en avais le plus besoin et qui continue encore de me conseiller et de m'inspirer, Océane et Audrey (les véritables Molk'queens) qui m'ont accompagnée tout au long de cette aventure et que je suis très fière de voir s'épanouir aujourd'hui et enfin Elise, le soleil et la nouvelle amie de ma dernière année. Nous avons eu l'opportunité d'accueillir plusieurs stagiaires, nos petites pousses, que je remercie tous pour leur sympathie et pour les bons moments au labo comme en dehors. Alors merci Océane, Johanna, Idir, Jason, Marielle et Alexandre et un grand merci à Manal, Tasnim et Olivia que j'ai pu encadrer ou co-encadrer, pour le travail qu'elles ont fourni, leur motivation et leur bonne humeur.

L'une des expériences les plus marquantes de ma thèse reste ma participation au concours Ma Thèse en 180 secondes. Je remercie tous ceux qui ont m'ont incitée à participer ou qui sont venus m'encourager. Je suis extrêmement reconnaissante envers Quentin Delépine, qui nous a préparés au concours avec bienveillance et humour et Olivier Richard, que j'ai rencontré sur une autre formation liée à la médiation scientifique et qui m'a beaucoup inspirée et encouragée à suivre cette voie. Enfin, ma participation à MT180 aurait été très différente si je n'avais pas pu la partager avec tous les autres participants, mais surtout avec Elodie Treuillet que je remercie sincèrement.

Le temps est aussi venu de remercier ceux qui n'ont pas participé à ma thèse, mais qui ont joué un rôle tout aussi important. Merci à ma famille et à ma belle-famille d'avoir été mes plus grands supporters et d'avoir vécu avec moi toutes mes inquiétudes et toutes mes petites victoires. Enfin, comment ne pas finir avec Florian, qui m'a suivie, encore une fois, qui m'a encouragée, aidée et supportée dans les deux sens du terme. Tout ça, c'est un peu grâce à toi, alors merci d'investir dans notre avenir, d'y avoir ajouté un Tassin (et puis mille autres bestioles) et merci d'être là tout simplement.

# Communications écrites et orales

## Publications dans des journaux internationaux à comité de lecture

- **Water-based microwave-assisted extraction of pigments from madder optimized by a box-behnken design.** Chambaud M., Colas C., Destandau, E. *Separations* **2023**, 10, 433, doi: 10.3390/separations10080433
- **Oil/water biphasic solvent system for the eco-extraction and cosmetic formulation of *Bixa orellana* L.** Chambaud M., Fournier A., De Saint Jores C., Caux B., Colas C., Destandau E.. *Plants* **2024**, 13, 1940, doi : 10.3390/plants13141940

## Chapitre de livre

- **Optimizing the Water-based Extraction of *Rubia tinctorum* L. Pigments.** Chambaud M., Guyomarch R., Destandau E. *ATHENA Research Book* **2023**, 2, 541-545, doi: 10.18690/um.4.2023.48, ISBN : 978-961-286-783-6

## Acte de colloque

- **Eco-responsible water-based extraction of plant pigments.** Chambaud M., Guyomarch R., Destandau E. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2023**, 45, 13, doi: 10.1111/ics.12921

## Communications orales

### Dans un congrès international

- **Development of aqueous eco-extraction methods of pigments from three dye plants,** Chambaud M., Destandau E., *FBN2P webinar*, juin 2024
- **Development of aqueous eco-extraction methods of polar and non-polar pigments,** Chambaud M., Destandau E., *ATHENA European University PhD conference : Green Transition: Advancing Academia's Role in Sustainable Innovation*, juin 2024

### Dans un congrès national

- **Pigments et bioactifs du roucou (*Bixa orellana* L.) : obtention d'un ingrédient multifonctionnel biosourcé,** Chambaud M., Destandau E., *Journée du GDR Cosm'actifs* (Evreux), novembre 2023
- **Eco-Extraction de pigments végétaux : optimisation d'une extraction à l'eau,** Chambaud M., Colas C., Guyomarch R., Destandau E., *Webinaire de l'AFERP*, mars 2023
- **Extraction verte des pigments de *Rubia tinctorum* L.,** Chambaud M., Colas C., Guyomarch R., Destandau E., *6e colloque du GDR Cosm'actifs* (Reims), novembre 2022
- **Optimisation par plan d'expériences avec méthodologie de surface de réponse de l'extraction verte des pigments de *Rubia tinctorum* L. par micro-ondes,** Chambaud M., Destandau E., *Journées virtuelles de l'AFERP*, juillet 2022

## Communications par poster

### Dans un congrès international

- **Water as a green solvent to extract polar and non-polar plant pigments,** Chambaud M., Guyomarch R., Destandau E., *International congress on natural products research* (Cracovie), juillet 2024
- **Direct extraction and formulation of *Bixa orellana* L. using a green biphasic solvent,** Chambaud M., Guyomarch R., Destandau E., *International congress on natural products research* (Cracovie), juillet 2024
- **Extraction of annatto from *Bixa orellana* L. using a bio-based biphasic solvent,** Chambaud M., Guyomarch R., Destandau E., *LE STUDIUM conference « Plant rediscovery with advanced tools for well-being applications »* (Orléans), octobre 2023

## VALORISATION SCIENTIFIQUE

- **Eco-responsible water-based extraction of plant pigments**, Chambaud M., Guyomarch R., Destandau E., *Cosm'ing 10th edition*, juillet 2023
- **Optimisation of a sustainable oil/water extraction of annatto (*Bixa orellana* L.)**, Chambaud M., Guyomarch R., Destandau E., 6e symposium international de l'AFERP, juillet 2023
- **Eco-responsible water-based extraction of plant pigments**, Chambaud M., Guyomarch R., Destandau E., *Cosm'innov 5th edition* (Orléans), mai 2023
- **Water microwave assisted extraction (MAE) of colored compounds from madder (*Rubia tinctorum* L.)**, Chambaud M., Colas C., Guyomarch R., Destandau E., Analytics (Nantes), septembre 2022

### Dans un congrès national

- **Water microwave assisted extraction (MAE) of colored compounds from madder (*Rubia tinctorum* L.)**, Chambaud M., Colas C., Guyomarch R., Destandau E., 34e colloque du Biotechnocentre, octobre 2022

# Sommaire

|                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introduction générale .....</b>                                                     | <b>21</b> |
| <b>I. Chapitre I .....</b>                                                             | <b>25</b> |
| <b>I. Introduction.....</b>                                                            | <b>26</b> |
| <b>II. Les colorants végétaux .....</b>                                                | <b>28</b> |
| A. Classification des colorants issus des plantes supérieures .....                    | 28        |
| 1. Chlorophylles.....                                                                  | 29        |
| 2. Flavonoïdes, aurones et chalcones .....                                             | 30        |
| a. Flavonoïdes.....                                                                    | 31        |
| b. Homoisflavonoïdes.....                                                              | 34        |
| c. Aurones, chalcones et autres dérivés de flavonoïdes .....                           | 35        |
| 3. Autres composés phénoliques .....                                                   | 35        |
| a. Curcuminoïdes et phénylphénalénones .....                                           | 35        |
| b. Quinones .....                                                                      | 36        |
| c. Xanthones.....                                                                      | 38        |
| 4. Polymères de composés phénoliques .....                                             | 38        |
| a. Tanins .....                                                                        | 38        |
| b. Mélanines .....                                                                     | 39        |
| 5. Terpènes.....                                                                       | 40        |
| a. Iridoïdes.....                                                                      | 41        |
| b. Caroténoïdes .....                                                                  | 41        |
| 6. Composés azotés.....                                                                | 43        |
| a. Bétalaïnes .....                                                                    | 43        |
| b. Indigoïdes .....                                                                    | 44        |
| c. Alcaloïdes benzylisoquinolines .....                                                | 45        |
| B. L'usage cosmétique des colorants d'origine végétale .....                           | 46        |
| 1. Colorants utilisés en cosmétique .....                                              | 46        |
| a. Brève histoire des colorants cosmétiques.....                                       | 46        |
| b. Colorants utilisés aujourd'hui.....                                                 | 47        |
| 2. Principales activités biologiques d'intérêt cosmétique.....                         | 49        |
| a. Activité antioxydante .....                                                         | 49        |
| b. Activité anti-âge.....                                                              | 50        |
| c. Filtres anti-UV .....                                                               | 51        |
| <b>III. L'eau comme solvant vert pour l'extraction des colorants végétaux.....</b>     | <b>53</b> |
| A. Aspects environnementaux .....                                                      | 53        |
| 1. L'éco-extraction à l'eau .....                                                      | 53        |
| a. Définition de l'éco-extraction.....                                                 | 53        |
| b. L'eau : un solvant vert .....                                                       | 54        |
| 2. Les défis environnementaux liés à l'extraction à l'eau .....                        | 57        |
| B. Capacité d'extraction de l'eau .....                                                | 58        |
| 1. Polarité de l'eau .....                                                             | 58        |
| 2. Solubilité des colorants végétaux dans l'eau .....                                  | 59        |
| C. Revue des méthodes d'extraction à l'eau utilisées pour les colorants végétaux ..... | 61        |
| 1. Méthodes d'extraction conventionnelles .....                                        | 61        |
| a. Extractions à l'eau .....                                                           | 61        |
| b. Modulation du pH .....                                                              | 64        |
| 2. Techniques d'éco-extraction.....                                                    | 66        |
| a. Extraction assistée par ultrasons.....                                              | 66        |
| b. Extraction assistée par micro-ondes .....                                           | 69        |
| c. Extraction à haute pression.....                                                    | 71        |
| d. Méthodes électrochimiques et irradiation gamma.....                                 | 73        |
| 3. Extraction assistée chimiquement ou par enzyme .....                                | 75        |

# SOMMAIRE

|             |                                                                                   |            |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| a.          | Ajout de co-solvants verts .....                                                  | 75         |
| b.          | Cyclodextrines .....                                                              | 77         |
| c.          | Tensioactifs.....                                                                 | 78         |
| d.          | Extraction enzymatique.....                                                       | 79         |
| 4.          | Conclusions .....                                                                 | 80         |
| <b>IV.</b>  | <b>Stratégie de la thèse.....</b>                                                 | <b>83</b>  |
| <b>II.</b>  | <b>Chapitre II .....</b>                                                          | <b>85</b>  |
| <b>I.</b>   | <b>Introduction.....</b>                                                          | <b>86</b>  |
| <b>II.</b>  | <b>La garance des teinturiers (<i>Rubia tinctorum</i> L.).....</b>                | <b>87</b>  |
| A.          | Description de la plante .....                                                    | 87         |
| B.          | Composition de la racine .....                                                    | 88         |
| 1.          | Anthraquinones.....                                                               | 88         |
| 2.          | Flavonoïdes et acides cinnamiques.....                                            | 92         |
| 3.          | Autres.....                                                                       | 92         |
| C.          | Histoire du colorant issu de <i>Rubia tinctorum</i> .....                         | 93         |
| D.          | Extraction des anthraquinones de la garance.....                                  | 94         |
| 1.          | Extraction par des solvants organiques .....                                      | 94         |
| 2.          | Extraction à l'eau.....                                                           | 96         |
| 3.          | Conclusion et choix de la méthode d'extraction.....                               | 96         |
| <b>III.</b> | <b>Optimisation de l'extraction à l'eau de la racine de garance .....</b>         | <b>97</b>  |
| A.          | Optimisation par plan d'expériences de l'extraction assistée par micro-ondes..... | 97         |
| 1.          | Choix des facteurs et niveaux.....                                                | 97         |
| 2.          | Réalisation du plan d'expériences.....                                            | 99         |
| B.          | Optimisation de la couleur.....                                                   | 102        |
| C.          | Validation de l'extrait optimal .....                                             | 103        |
| <b>IV.</b>  | <b>Comparaison de l'extrait optimal à des extraits de référence.....</b>          | <b>105</b> |
| A.          | Comparaison à des méthodes d'extraction hydroalcoolique conventionnelles.....     | 105        |
| 1.          | Soxhlet.....                                                                      | 105        |
| 2.          | Chauffage sous agitation .....                                                    | 106        |
| B.          | Comparaison à d'autres méthodes d'extraction à l'eau .....                        | 106        |
| 1.          | Extraction par liquide pressurisé.....                                            | 106        |
| 2.          | Extraction assistée par ultrasons.....                                            | 107        |
| C.          | Comparaison de différents solvants par MAE.....                                   | 108        |
| 1.          | MAE hydroalcoolique .....                                                         | 108        |
| 2.          | MAE à pH basique .....                                                            | 108        |
| D.          | Comparaison globale .....                                                         | 109        |
| <b>V.</b>   | <b>Composition de l'extrait optimisé .....</b>                                    | <b>109</b> |
| A.          | Détection des sucres par HR-CCM .....                                             | 109        |
| B.          | Dosage des composés phénoliques totaux et anthraquinones .....                    | 112        |
| 1.          | Dosage des composés phénoliques totaux : méthode de Folin-Ciocalteu.....          | 112        |
| 2.          | Dosage des anthraquinones.....                                                    | 114        |
| C.          | Identification des principaux composés par UHPLC-HRMS/MS.....                     | 115        |
| 1.          | Anthraquinones.....                                                               | 116        |
| 2.          | Acides phénoliques et flavonoïdes.....                                            | 118        |
| 3.          | Conclusions sur la composition du colorant .....                                  | 125        |
| <b>VI.</b>  | <b>Conclusion .....</b>                                                           | <b>125</b> |
| <b>III.</b> | <b>Chapitre III .....</b>                                                         | <b>127</b> |
| <b>I.</b>   | <b>Introduction.....</b>                                                          | <b>128</b> |
| <b>II.</b>  | <b>Le rocouyer (<i>Bixa orellana</i> L.).....</b>                                 | <b>129</b> |
| A.          | Description de la plante .....                                                    | 129        |
| B.          | Composition générale de la graine de rocou .....                                  | 130        |

# SOMMAIRE

|             |                                                                            |            |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.          | Apocaroténoïdes et autres caroténoïdes.....                                | 130        |
| 2.          | Autres terpènes et composés volatils .....                                 | 132        |
| 3.          | Tocophérols et tocotriénols .....                                          | 132        |
| 4.          | Composés phénoliques .....                                                 | 133        |
| C.          | Usages en tant que colorant .....                                          | 133        |
| <b>III.</b> | <b>Détermination de la méthode d'extraction .....</b>                      | <b>134</b> |
| A.          | Méthodes d'extraction décrites du colorant issu du roucou .....            | 134        |
| 1.          | Extraction à l'huile.....                                                  | 134        |
| 2.          | Extraction à l'eau.....                                                    | 135        |
| 3.          | Extraction par d'autres types de solvants .....                            | 135        |
| B.          | Choix de l'huile végétale .....                                            | 136        |
| 1.          | Les huiles végétales comme solvant d'extraction .....                      | 136        |
| 2.          | Sélection des huiles végétales à étudier .....                             | 137        |
| C.          | Analyse de la composition des huiles .....                                 | 138        |
| 1.          | Analyse SFC-MS des acides gras.....                                        | 138        |
| 2.          | Analyses physico-chimiques des huiles.....                                 | 141        |
| <b>IV.</b>  | <b>Optimisation de l'extraction .....</b>                                  | <b>143</b> |
| A.          | Optimisation de l'extraction assistée par ultrason .....                   | 143        |
| 1.          | Sélection des paramètres à optimiser.....                                  | 143        |
| 2.          | Plan d'expériences .....                                                   | 144        |
| 3.          | Détermination de l'extrait optimal .....                                   | 145        |
| B.          | Optimisation du solvant.....                                               | 146        |
| 1.          | Comparaison de l'extraction du colorant par les différentes huiles .....   | 146        |
| 2.          | Activité antioxydantes des phases huiles.....                              | 148        |
| 3.          | Activité antioxydante des phases eau .....                                 | 149        |
| 4.          | Composition des phases aqueuses obtenues avec les différentes huiles ..... | 150        |
| <b>V.</b>   | <b>Composition de l'extrait .....</b>                                      | <b>153</b> |
| A.          | Analyse par UHPLC-HRMS/MS de la phase eau .....                            | 153        |
| 1.          | Acides phénoliques .....                                                   | 155        |
| 2.          | Ellagitannins .....                                                        | 156        |
| 3.          | Autres composés détectés .....                                             | 157        |
| B.          | Analyse de la composition de la phase huile .....                          | 161        |
| 1.          | Extraction liquide-liquide .....                                           | 161        |
| 2.          | Analyse UHPLC-HRMS/MS .....                                                | 161        |
| 3.          | Comparaison à un extrait de référence .....                                | 162        |
| 4.          | Dosage du colorant .....                                                   | 163        |
| C.          | Analyse de la fraction volatile par SPME-GC-MS .....                       | 163        |
| 1.          | Préparation d'échantillon.....                                             | 163        |
| 2.          | Analyse par chromatographie en phase gazeuse.....                          | 163        |
| <b>VI.</b>  | <b>Conclusions.....</b>                                                    | <b>165</b> |
| <b>IV.</b>  | <b>Chapitre IV .....</b>                                                   | <b>167</b> |
| <b>I.</b>   | <b>Introduction.....</b>                                                   | <b>168</b> |
| <b>II.</b>  | <b>Le campêche (<i>Haematoxylum campechianum</i> L.) .....</b>             | <b>169</b> |
| A.          | Description de la plante .....                                             | 169        |
| B.          | Composition.....                                                           | 170        |
| 1.          | Homoïsoflavonoïdes.....                                                    | 170        |
| 2.          | Chalcones et flavonoïdes .....                                             | 171        |
| 3.          | Autres.....                                                                | 172        |
| C.          | Usages du colorant issu du campêche .....                                  | 173        |
| <b>III.</b> | <b>Extraction assistée par ultrasons.....</b>                              | <b>173</b> |
| A.          | Comparaison de différents solvants .....                                   | 174        |
| B.          | Profil chromatographique des trois extraits .....                          | 175        |
| <b>IV.</b>  | <b>Composition de l'extrait aqueux .....</b>                               | <b>177</b> |

# SOMMAIRE

|             |                                                                                         |            |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| A.          | Détection des sucres et acides aminés par HR-CCM.....                                   | 177        |
| B.          | Dosage des composés phénoliques totaux.....                                             | 179        |
| C.          | Etude du colorant .....                                                                 | 179        |
| 1.          | Dosage de l'hématéine.....                                                              | 179        |
| 2.          | Effet du pH sur la couleur de l'extrait .....                                           | 181        |
| D.          | Analyse UHPLC-DAD-HRMS/MS.....                                                          | 182        |
| <b>V.</b>   | <b>Stabilité de la couleur de l'extrait .....</b>                                       | <b>186</b> |
| A.          | Stabilité dans les trois solvants d'extraction.....                                     | 187        |
| B.          | Comparaison de la stabilité en fonction de la méthode d'extraction.....                 | 188        |
| <b>VI.</b>  | <b>Essais de stabilisation pendant l'extraction .....</b>                               | <b>189</b> |
| A.          | Acidification du solvant.....                                                           | 190        |
| B.          | Ajout de composés antioxydants et co-pigmentation .....                                 | 191        |
| C.          | Encapsulation.....                                                                      | 194        |
| 1.          | $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ cyclodextrines .....                                     | 195        |
| 2.          | Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine .....                                             | 196        |
| D.          | NaDES.....                                                                              | 198        |
| E.          | Conclusions sur la stabilisation du colorant.....                                       | 200        |
| <b>VII.</b> | <b>Conclusion .....</b>                                                                 | <b>200</b> |
| <b>V.</b>   | <b>Chapitre V.....</b>                                                                  | <b>202</b> |
| <b>I.</b>   | <b>Introduction.....</b>                                                                | <b>203</b> |
| <b>II.</b>  | <b>Activité biologique des extraits optimisés .....</b>                                 | <b>204</b> |
| A.          | Activité antioxydante .....                                                             | 204        |
| 1.          | Garance .....                                                                           | 205        |
| 2.          | Campêche.....                                                                           | 207        |
| a.          | Test d'activité ABTS .....                                                              | 207        |
| b.          | Bioautographie DPPH .....                                                               | 208        |
| 3.          | Roucou .....                                                                            | 210        |
| B.          | Activité anti-UV .....                                                                  | 210        |
| 1.          | Molécules de référence.....                                                             | 211        |
| 2.          | Extraits.....                                                                           | 212        |
| 3.          | Facteur de protection solaire .....                                                     | 213        |
| <b>III.</b> | <b>Formulation d'extraits secs et liquides .....</b>                                    | <b>215</b> |
| A.          | Formulation de l'extrait sec de garance dans un shampoing .....                         | 215        |
| B.          | Formulation directe de l'extrait biphasique de roucou dans une crème capillaire .....   | 217        |
| 1.          | Crème blanche .....                                                                     | 217        |
| a.          | Formulation .....                                                                       | 217        |
| b.          | Caractérisation .....                                                                   | 218        |
| 2.          | Crème enrichie en extrait de roucou .....                                               | 218        |
| C.          | Extraction de la garance et du roucou dans une solution de tensioactif.....             | 219        |
| <b>IV.</b>  | <b>Vers un procédé en une étape intégrant extraction et formulation .....</b>           | <b>222</b> |
| A.          | Formulation directe des poudres de plantes .....                                        | 222        |
| 1.          | Formulation des trois plantes dans un shampoing Terre de Couleur .....                  | 223        |
| a.          | Analyse de la couleur.....                                                              | 223        |
| b.          | Stabilité de la couleur .....                                                           | 225        |
| 2.          | Formulation directe du roucou dans une crème.....                                       | 227        |
| B.          | Développement d'un procédé intégré d'extraction/formulation du roucou .....             | 229        |
| <b>V.</b>   | <b>Conclusions.....</b>                                                                 | <b>230</b> |
|             | <b>Conclusion générale.....</b>                                                         | <b>233</b> |
| <b>A.</b>   | <b>Annexes .....</b>                                                                    | <b>239</b> |
|             | <b>Annexe 1 : Matériel végétal, solvants, standards et ingrédients cosmétiques.....</b> | <b>240</b> |
| A.          | Matériel végétal .....                                                                  | 240        |

# SOMMAIRE

|                                                                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| B. Solvants.....                                                                                                     | 240        |
| C. Réactifs et standards.....                                                                                        | 240        |
| D. Ingrédients cosmétiques.....                                                                                      | 241        |
| <b>Annexe 2 : Détail des méthodes d'extraction .....</b>                                                             | <b>242</b> |
| A. Chauffage sous agitation.....                                                                                     | 242        |
| B. Soxhlet .....                                                                                                     | 242        |
| C. Extraction assistée par ultrasons .....                                                                           | 242        |
| 1. Bain à ultrasons .....                                                                                            | 242        |
| 2. Réacteur R.E.U.S.....                                                                                             | 242        |
| D. Extraction assistée par micro-ondes.....                                                                          | 242        |
| E. Extraction par liquide pressurisés.....                                                                           | 243        |
| F. Traitements post extraction.....                                                                                  | 243        |
| 1. Elimination du matériel végétal .....                                                                             | 243        |
| 2. Séchage .....                                                                                                     | 243        |
| 3. Préparation d'échantillons avant analyse .....                                                                    | 243        |
| <b>Annexe 3 : Spectrophotométrie UV-visible .....</b>                                                                | <b>245</b> |
| A. Appareillages.....                                                                                                | 245        |
| B. Spectres UV-visibles des extraits .....                                                                           | 245        |
| 1. Garance .....                                                                                                     | 245        |
| 2. Roucou .....                                                                                                      | 245        |
| 3. Campêche.....                                                                                                     | 246        |
| <b>Annexe 4 : Dosage des composés phénoliques totaux : test de Folin-Ciocalteu.....</b>                              | <b>247</b> |
| A. Protocole général.....                                                                                            | 247        |
| B. Protocole modifié .....                                                                                           | 247        |
| <b>Annexe 5 : Chromatographie sur couche mince haute performance (HR-CCM) .....</b>                                  | <b>249</b> |
| A. Appareillage .....                                                                                                | 249        |
| B. Méthode acides aminés et sucres.....                                                                              | 249        |
| C. Méthode DPPH .....                                                                                                | 250        |
| <b>Annexe 6 : Chromatographie liquide haute performance (HPLC-DAD-DEDL).....</b>                                     | <b>251</b> |
| A. Appareillage et colonne .....                                                                                     | 251        |
| B. Analyses des extraits de garance .....                                                                            | 251        |
| C. Méthode campêche .....                                                                                            | 252        |
| <b>Annexe 7 : Chromatographie ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-DAD-HRMS) .....</b> | <b>253</b> |
| A. Appareillage .....                                                                                                | 253        |
| B. Caractérisation de l'extrait de garance .....                                                                     | 253        |
| C. Analyse MS des phases aqueuses des extraits de roucou pour un retraitement statistique .....                      | 254        |
| D. Caractérisation des phases aqueuses des extraits de roucou .....                                                  | 254        |
| E. Caractérisation des phases huile des extraits de roucou.....                                                      | 254        |
| F. Caractérisation de l'extrait de campêche .....                                                                    | 255        |
| <b>Annexe 8 : SPME-GC-MS de l'extrait total de roucou .....</b>                                                      | <b>256</b> |
| A. Micro-extraction sur phase solide (SPME) .....                                                                    | 256        |
| B. Analyse GC-MS.....                                                                                                | 256        |
| <b>Annexe 9 : Analyse SFC-MS des huiles végétales utilisées pour l'extraction du roucou.....</b>                     | <b>257</b> |
| <b>Annexe 10 : Propriétés physico-chimiques des huiles .....</b>                                                     | <b>258</b> |
| A. Densité .....                                                                                                     | 258        |
| B. Tension interfaciale huile-eau.....                                                                               | 258        |
| C. Viscosité .....                                                                                                   | 258        |
| <b>Annexe 11 : Tests d'activité antioxydante .....</b>                                                               | <b>259</b> |
| A. Préparation des échantillons .....                                                                                | 259        |
| B. DPPH .....                                                                                                        | 259        |
| C. ABTS .....                                                                                                        | 259        |

## SOMMAIRE

|                                                                         |                    |            |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------|
| D.                                                                      | FRAP .....         | 260        |
| E.                                                                      | CUPRAC .....       | 260        |
| <b>Annexe 12 : Valeurs EE × I utilisées pour le calcul du SPF .....</b> |                    | <b>262</b> |
| <b>Annexe 13 : Formulation du shampoing de Terre de Couleur .....</b>   |                    | <b>263</b> |
| <b>Annexe 14 : Spectrophotométrie L*a*b* .....</b>                      |                    | <b>264</b> |
| A.                                                                      | Appareillage ..... | 264        |
| B.                                                                      | Analyses .....     | 264        |
| <b>Références .....</b>                                                 |                    | <b>265</b> |

## Liste des abréviations

|                         |                                                                                                         |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Abs.</b>             | Absorbance                                                                                              |
| <b>ABTS</b>             | Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)                                              |
| <b>ACP</b>              | Analyse en Composantes Principales                                                                      |
| <b>ADN</b>              | Acide désoxyribonucléique                                                                               |
| <b>AG</b>               | Acide Gallique ou Acide Gras                                                                            |
| <b>AlCl<sub>3</sub></b> | Chlorure d'aluminium                                                                                    |
| <b>ANOVA</b>            | Analyse de variance (Analysis Of Variance)                                                              |
| <b>APCI</b>             | Ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)                 |
| <b>ASE</b>              | Extraction accélérée par solvant (Accelerated Solvent Extraction)                                       |
| <b>BPC</b>              | Base Peak Chromatogram                                                                                  |
| <b>br</b>               | Large (broad)                                                                                           |
| <b>C.I.</b>             | Color Index                                                                                             |
| <b>CCM</b>              | Chromatographie sur Couche Mince                                                                        |
| <b>CD</b>               | Cyclodextrine                                                                                           |
| <b>CIELAB</b>           | Espace chromatique L*a*b* défini par la Commission internationale de l'éclairage (CIE)                  |
| <b>CMC</b>              | Concentration micellaire critique                                                                       |
| <b>CN</b>               | Nombre de carbones (Carbon number)                                                                      |
| <b>Cu</b>               | Cuivre                                                                                                  |
| <b>CUPRAC</b>           | Capacité antioxydante réductrice du cuivre (CUPric Reducing Antioxidant Capacity)                       |
| <b>DAD</b>              | Détecteur à barette de diodes (Diod Array Detector)                                                     |
| <b>DEDL</b>             | Détecteur Évaporatif à Diffusion de la Lumière                                                          |
| <b>DOPA</b>             | 3,4-dihydroxyphénylalanine                                                                              |
| <b>DPPH</b>             | 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle                                                                          |
| <b>ECN</b>              | Nombre de carbones équivalents (Equivalent Carbon Number)                                               |
| <b>eq.</b>              | Equivalent                                                                                              |
| <b>ERO</b>              | Espèces Réactives de l'Oxygène                                                                          |
| <b>ESI</b>              | Ionisation par électrospray (Electrospray Ionisation)                                                   |
| <b>eV</b>               | Electron Volts                                                                                          |
| <b>FAO</b>              | Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organisation) |
| <b>Fe</b>               | Fer                                                                                                     |
| <b>FPS</b>              | Facteur de Protection Solaire                                                                           |
| <b>FRAP</b>             | Pouvoir antioxydant réducteur du fer ferrique (Ferric Reducing Antioxidant Power)                       |
| <b>g</b>                | Pesanteur à la surface de la Terre                                                                      |
| <b>GC</b>               | Chromatographie en phase gazeuse (Gas Chromatography)                                                   |
| <b>Hn</b>               | Hématéine                                                                                               |
| <b>HPLC</b>             | Chromatographie en phase liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography)           |
| <b>HPTLC</b>            | High-performance thin-layer chromatography (cf HR-CCM)                                                  |
| <b>HP-β-CD</b>          | Hydroxypropyl-β-cyclodextrine                                                                           |
| <b>HR-CCM</b>           | Chromatographie sur Couche Mince Haute Résolution                                                       |
| <b>HRMS/MS</b>          | Spectrométrie de masse de haute résolution (High Resolution Mass spectrometry) en tandem                |

## LISTE DES ABBREVIATIONS

|                                     |                                                                             |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>INCI</b>                         | International Nomenclature of Cosmetic Ingredients                          |
| <b>IR</b>                           | Indice de rétention                                                         |
| <b>K</b>                            | Degrés Kelvin                                                               |
| <b>kGy</b>                          | Kilogray                                                                    |
| <b>kHz</b>                          | Kilohertz                                                                   |
| <b>LGH</b>                          | NaDES contenant acide lactique et glucose                                   |
| <b>LLE</b>                          | Extraction liquide-liquide (Liquid-Liquid Extraction)                       |
| <b>LogP</b>                         | Coefficient de partage entre l'octanol et l'eau                             |
| <b>m/m</b>                          | masse/masse                                                                 |
| <b>m/z</b>                          | Rapport masse/charge                                                        |
| <b>MAE</b>                          | Extraction assistée par micro-ondes (Microwave-Assisted Extraction)         |
| <b>MHz</b>                          | Mégahertz                                                                   |
| <b>mN</b>                           | Millinewtons                                                                |
| <b>MS</b>                           | Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)                                  |
| <b>n</b>                            | Nombre de doubles liaisons                                                  |
| <b>n</b>                            | Nombre de réplicats                                                         |
| <b>Na</b>                           | Sodium                                                                      |
| <b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> | Carbonate de sodium                                                         |
| <b>NaDES</b>                        | Solvant eutectique profond naturel                                          |
| <b>NaOH</b>                         | Hydroxyde de sodium                                                         |
| <b>Nc</b>                           | Néocuproïne                                                                 |
| <b>nm</b>                           | Nanomètres                                                                  |
| <b>OMS</b>                          | Organisation Mondiale de la Santé                                           |
| <b>Pa</b>                           | Pascals                                                                     |
| <b>PC</b>                           | Composantes Principales                                                     |
| <b>PEF</b>                          | Champs électrique pulsé (Pulsed Electric Field)                             |
| <b>PGU</b>                          | Unités de polygalacturonase (Polygalacturonase Units)                       |
| <b>PLE</b>                          | Extraction par liquide pressurisé (Pressurised Liquid Extraction)           |
| <b>PMH</b>                          | NaDES contenant L-proline et acide malique                                  |
| <b>ppm</b>                          | Parties Par Millions                                                        |
| <b>PVDF</b>                         | Polyfluorure de vinylidène                                                  |
| <b>R<sup>2</sup></b>                | Coefficient de régression                                                   |
| <b>Rf</b>                           | Rapport frontal                                                             |
| <b>RVB</b>                          | Espace chromatique Rouge Vert Bleu                                          |
| <b>SFC</b>                          | Chromatographie en phase supercritique (Supercritical Fluid Chromatography) |
| <b>sh</b>                           | Epaulement (shoulder)                                                       |
| <b>SO<sub>2</sub></b>               | Dioxyde de soufre                                                           |
| <b>sp.</b>                          | Espèce                                                                      |
| <b>SPME</b>                         | Micro-extraction sur phase solide (Solid Phase Micro-Extraction)            |
| <b>spp.</b>                         | Plusieurs espèces                                                           |
| <b>tan δ</b>                        | Facteur de dissipation                                                      |
| <b>TIC</b>                          | Courant d'ion total (Total Ion Chromatogram)                                |
| <b>TiO<sub>2</sub></b>              | Dioxyde de titane                                                           |
| <b>TPTZ</b>                         | 2,4,6-tri-2-pyridinyl-1,3,5-triazine                                        |

## LISTE DES ABBREVIATIONS

|                                    |                                                                                                |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tr</b>                          | Temps de rétention                                                                             |
| <b>u.a.</b>                        | Unité arbitraire                                                                               |
| <b>UAE</b>                         | Extraction assistée par ultrasons (Ultrasound-Assisted Extraction)                             |
| <b>UHPLC</b>                       | Chromatographie liquide ultra-haute performance (Ultra High Performance Liquid Chromatography) |
| <b>UV</b>                          | Ultraviolets                                                                                   |
| <b>W</b>                           | Watts                                                                                          |
| <b>Zn</b>                          | Zinc                                                                                           |
| <b>ZnO</b>                         | Oxyde de zinc                                                                                  |
| <b>[C]</b>                         | Concentration                                                                                  |
| <b><math>\Delta E</math></b>       | Delta E (différence de couleur)                                                                |
| <b>°C</b>                          | Degrés Celsius                                                                                 |
| <b><math>\epsilon</math></b>       | Coefficient d'extinction molaire                                                               |
| <b><math>\epsilon'</math></b>      | Constante diélectrique                                                                         |
| <b><math>\epsilon''</math></b>     | Perte diélectrique                                                                             |
| <b><math>\lambda</math></b>        | Longueur d'onde                                                                                |
| <b><math>\lambda_{\max}</math></b> | Longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption                                          |

# Liste des figures

## Chapitre I

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure I-1:</b> Spectre visible .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 26 |
| <b>Figure I-2 :</b> Sélection de colorants végétaux de couleurs variées classés en fonction de leur longueur d'onde au maximum d'absorption et spectre des couleurs perçues par l'œil. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 28 |
| <b>Figure I-3 :</b> Structure des chlorophylles. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 29 |
| <b>Figure I-4 :</b> Squelettes de base des chalcones, aurones, flavonoïdes et homoisflavonoïdes et de leur précurseur. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 30 |
| <b>Figure I-5 :</b> Structure de l'ion flavylum et groupements différenciant les principales anthocyanes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 31 |
| <b>Figure I-6 :</b> Voies de dégradation des anthocyanes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 33 |
| <b>Figure I-7 :</b> Structure des principaux homoisflavonoïdes de type braziline et squelettes de base des autres homoisflavonoïdes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 34 |
| <b>Figure I-8 :</b> Structures de la carthamine, de la santaline et de la dracorubine. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 35 |
| <b>Figure I-9 :</b> Structures des principales curcumines et d'une phénylphénalénone. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 36 |
| <b>Figure I-10 :</b> Squelettes de base des benzoquinones, naphthoquinones et anthraquinones et structure de l'hypéricine. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 37 |
| <b>Figure I-11 :</b> Squelette de base des xanthones. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 38 |
| <b>Figure I-12 :</b> Structure des unités constitutives des tanins et illustration des structures des tanins hydrolysables. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 39 |
| <b>Figure I-13 :</b> Structures des principaux précurseurs des mélanines d'origine végétale. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 40 |
| <b>Figure I-14 :</b> Structures de la génipine et de ses dérivés. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 41 |
| <b>Figure I-15 :</b> Structures du précurseur des caroténoïdes (phytoène) et d'un représentant des carotènes ( $\beta$ -carotène), des xanthophylles (zéaxanthine) et des apocaroténoïdes (bixine). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 42 |
| <b>Figure I-16 :</b> Structures du précurseur des bétalaines (acide bétalamique), ainsi que d'une bétacyanine (bétanidine) et d'une bétaxanthine (vulgaxanthine I). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 44 |
| <b>Figure I-17 :</b> Schéma simplifié de la biosynthèse de l'indigotine et de l'indirubine. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 44 |
| <b>Figure I-18 :</b> Structures de la berbérine et de la sanguinarine. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 45 |
| <b>Figure I-19 :</b> Les six principes de l'éco-extraction. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 54 |
| <b>Figure I-20 :</b> Constante diélectrique d'une sélection de solvants d'extraction (orange), de solvants verts autorisés en cosmétique (vert) et de l'eau dans différents conditions (bleu). Les constantes diélectriques utilisées sont celles des solvants à 20°C, excepté pour l'eau à 100°C et l'eau subcritique. Données issues de [92–94]. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 58 |
| <b>Figure I-21 :</b> Représentation de la polarité et de la solubilité des colorants végétaux. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 60 |
| <b>Figure I-22 :</b> Schéma du diagramme de l'eau représentant les seuils de température et de pression des différents états de l'eau adapté de Zhang et al. [221]. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 72 |
| <b>Figure I-23 :</b> Résumé de l'efficacité des méthodes d'extraction des colorants végétaux décrites, basé sur un schéma simplifié de la Figure I-21 qui représente la polarité des principaux colorants végétaux décrits. Les méthodes d'extraction dont l'efficacité est comparable ont été regroupée. A : Extractions conventionnelles et UAE, B : MAE et PLE, C : méthodes basées sur l'ajout de co-solvant, d'adjuvants ou d'enzymes. En vert, les colorants généralement extraits plus efficacement par la méthode aqueuse que par les solvants de référence, en orange les colorants généralement extraits plus efficacement par les solvants de référence en violet les colorants pour lesquels au moins une méthode aqueuse est décrite, mais sans comparaison avec un solvant de référence et en gris les colorants pour lesquels la méthode aqueuse n'a pas été décrite. .... | 82 |

## Chapitre II

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure II-1 :</b> Représentations de la garance des teinturiers ( <i>Rubia tinctorum</i> L.). A : Illustration botanique provenant du guide des Plantes médicinales de Köhler [288], B, C et D : photographies de <i>Rubia tinctorum</i> présentes sur l'eFlore de Tela botanica [287]. Auteurs : B et D : Liliane Roubaudi, C : Paul Fabre. ....                | 88  |
| <b>Figure II-2 :</b> Structure de base des anthraquinones. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 89  |
| <b>Figure II-3 :</b> Structure des autres composés décrits dans la garance des teinturiers. ....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 93  |
| <b>Figure II-4 :</b> Superposition des chromatogrammes UV (280 nm) obtenus après chacun des 5 cycles d'extraction (1000 W, 100 mg/mL eau, cycles de 30 s). ....                                                                                                                                                                                                     | 98  |
| <b>Figure II-5 :</b> Spectre d'absorption (300-700 nm) de l'extrait de garance obtenu par MAE à l'eau. ....                                                                                                                                                                                                                                                         | 99  |
| <b>Figure II-6 :</b> Diagrammes de surface représentant l'effet des interactions entre les trois facteurs étudiés sur le rendement. A : Puissance et ratio plante/eau, le nombre de cycles étant fixé à 5. B : Nombre de cycles et puissance, le ratio étant fixé à 550 mg/20 mL. C : Nombres de cycles et ratio plante/eau, la puissance étant fixée à 600 W. .... | 101 |

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure II-7 :</b> Diagramme de répartition des extraits du plan d'expériences en fonction de leur rendement d'extraction et de leur absorbance à 500 nm. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 102 |
| <b>Figure II-8:</b> Spectre d'absorbance des extraits 13 (rose) et 16 (orange) et tableau représentant la moyenne des rendements et l'absorbance à 500 nm de leurs 3 réplicats. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 104 |
| <b>Figure II-9 :</b> Schéma du diagramme de l'eau adapté de Zhang et al. [221] et représentation des conditions d'extraction décrites dans ce chapitre. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 104 |
| <b>Figure II-10 :</b> Spectre d'absorbance dans le visible (350-700 nm) de l'extrait optimal obtenu par MAE (extrait 13) et de l'extrait obtenu après 18 h de macération dans l'éthanol 50%. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 106 |
| <b>Figure II-11 :</b> Chromatogramme UV à 280 nm (orange) et DEDL (bleu) de l'extrait MAE optimal. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 110 |
| <b>Figure II-12 :</b> Plaque HR-CCM obtenue après la séparation et la révélation des sucres de l'extrait optimisé et des standards. L'échelle des rapports frontaux (Rf) est affichée. Phase stationnaire : silice gel60 F <sub>254</sub> , phase éluante : acétonitrile/eau 75/25. ....                                                                                                                                                                                                    | 111 |
| <b>Figure II-13 :</b> Dosage des composés phénoliques totaux. En bleu la droite d'étalonnage de l'acide gallique et en orange le dosage des deux réplicats de l'extrait optimisé de garance. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 113 |
| <b>Figure II-14 :</b> Dosage des anthraquinones. En bleu la droite d'étalonnage de l'alizarine et en orange le dosage des deux réplicats de l'extrait optimisé de garance. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 115 |
| <b>Figure II-15 :</b> Chromatogrammes UHPLC-ESI-QTOF de l'extrait optimal. Chromatogrammes ESI en mode négatif en haut (BPC), et en mode positif en bas (BPC). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 116 |
| <b>Figure II-16 :</b> Chromatogramme UHPLC-DAD correspondant aux absorbances à 280, 420 et 500 nm. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 125 |
| <b>Chapitre III</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
| <b>Figure III-1 :</b> Photographies de <i>Bixa orellana</i> présentes sur l'eFlore de Tela botanica [344]. A : arbuste entier, B : capsule mûre et graines, C : Fleur. Auteurs : A et B Liliane Roubaudi et C Geneviève Botti. ....                                                                                                                                                                                                                                                         | 130 |
| <b>Figure III-2 :</b> Voies d'isomérisation et de saponification de la bixine et de la norbixine et de leur dégradation en C17 et m-xylène. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 131 |
| <b>Figure III-3 :</b> Structure des principaux caroténoïdes et apocaroténoïdes du roucou autres que bixine et norbixine. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 131 |
| <b>Figure III-4 :</b> Structures des tocophérols et tocotriénols ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 132 |
| <b>Figure III-5 :</b> Structures des composés phénoliques décrits dans le roucou. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 133 |
| <b>Figure III-6 :</b> Chromatogrammes des 5 huiles végétales étudiées, obtenus en SFC-MS (TIC) et annotations des hypothèses d'identification des principaux triglycérides. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 139 |
| <b>Figure III-7 :</b> Photographie des phases huile obtenues dans le tube à centrifuger de 15 mL (à gauche) et de 50 mL (à droite). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 144 |
| <b>Figure III-8 :</b> Spectre d'absorption dans le visible (350-550 nm) des phases huile après une dilution par 10 dans l'heptane. T : tournesol, C : coco, R : raisin, O : olive, J : jojoba. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 147 |
| <b>Figure III-9 :</b> Activité antioxydante des huiles et phases huiles diluées par 2 mesurée par la capacité d'inhibition du DPPH. L'activité du trolox à 1 mg/mL (T1) et 0,1 mg/mL (T0,1) est utilisée comme référence. T : tournesol, C : coco, R : raisin, O : olive, J : jojoba. Tp, Cp, Rp, Op et Jp correspondent aux huiles, testées avant extraction. Les lettres a-e différentes désignent des taux d'inhibition significativement différents d'après l'analyse de variance. .... | 148 |
| <b>Figure III-10 :</b> Activité antioxydante des phases aqueuses diluées par 2 mesurée par la capacité d'inhibition de l'ABTS. L'activité du trolox à 1 mg/mL (T1) et 0,1 mg/mL (T0,1) est utilisée comme référence. T : tournesol, C : coco, R : raisin, O : olive, J : jojoba. Les lettres a-e différentes désignent des extraits significativement différents d'après l'analyse de variance. ....                                                                                        | 149 |
| <b>Figure III-11 :</b> ACP des analyses UHPLC-HRMS des phases aqueuses, construites à partir de la matrice complète (A) et de la matrice réduite (B). Les couleurs représentent les huiles d'extraction de chaque extrait : coco en jaune, raisin en violet, jojoba en rouge, olive en vert et tournesol en bleu. ....                                                                                                                                                                      | 151 |
| <b>Figure III-12 :</b> Heatmap représentant l'intensité des ions de la matrice réduite. L'intensité relative de chaque ion détecté par spectrométrie de masse est représentée selon une échelle allant du bleu (faible intensité) au rouge (intensité élevée). Les phases aqueuses de 3 réplicats indépendants ont été analysées pour chaque huile. Les ions sont ordonnés par similarité d'intensité entre les échantillons. ....                                                          | 152 |
| <b>Figure III-13 :</b> Chromatogramme à 280 nm et 465 nm. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 154 |
| <b>Figure III-14 :</b> Chromatogrammes à 280 nm et 450 nm des extraits méthanoliques issus de la phase huile de l'extrait biphasique de roucou (orange) et de l'huile de tournesol pure (vert). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 161 |
| <b>Figure III-15 :</b> Chromatogrammes UHPLC-UV (280 nm) de l'extrait méthanolique de la phase huile de l'extrait biphasique de roucou (orange) et de l'extrait acétate d'éthyle de roucou (bleu). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 162 |

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### Chapitre IV

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure IV-1 :</b> Représentations du campêche ( <i>Haematoxylum campechianum</i> L.). A : Illustration botanique provenant de la Flore pittoresque et médicale des Antilles, ou Histoire naturelle des plantes usuelles des colonies françaises, anglaises, espagnoles et portugaises [431], B, C et D : photographies de <i>Haematoxylum campechianum</i> présentes sur l'eFlore de Tela botanica. Auteur : Liliane Roubaudi [430].               | 170 |
| <b>Figure IV-2 :</b> Structure des homoisoflavonoïdes du campêche.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 171 |
| <b>Figure IV-3 :</b> Structures des chalcones et flavonoïdes du campêche.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 172 |
| <b>Figure IV-4 :</b> Spectre d'absorbance (300-650 nm) et photographie des extraits de campêche obtenus avec l'acétate d'éthyle (vert), l'eau (bleu) et l'éthanol (orange).                                                                                                                                                                                                                                                                           | 174 |
| <b>Figure IV-5 :</b> Chromatogrammes HPLC-DAD-DEDL des trois extraits de campêche. En vert l'extrait acétate d'éthyle, en bleu l'extrait eau et en orange l'extrait éthanol. Les chromatogrammes à 280 nm et 450 nm sont affichés en haut et les chromatogrammes DEDL sont affichés en bas. La molécule suspectée d'être l'hématéine est marquée par une étoile violette sur les chromatogrammes et son spectre d'absorption (200-700 nm) est inclus. | 176 |
| <b>Figure IV-6 :</b> Séparation et révélation des acides aminés et des sucres par HR-CCM. Eluant : acétonitrile/eau (75/25), plaque observée dans le visible et à 254 nm, et après révélation par la ninhydrine (acides aminés) et le réactif de molisch (sucres) dans le visible. Les fronts de solvants sont représentés par une ligne noire discontinue. La phase stationnaire est une plaque de silice gel60 F <sub>254</sub> .                   | 178 |
| <b>Figure IV-7 :</b> Spectre d'absorption de l'extrait de campêche (350-700 nm). Les deux bandes d'absorption correspondent à la forme neutre (Hn) et à la forme anionique de l'hématéine (Hn <sup>-</sup> ).                                                                                                                                                                                                                                         | 180 |
| <b>Figure IV-8 :</b> Spectres d'absorbance et photographie des puits correspondant à l'extrait aqueux de campêche dilué par 10 dans des tampons à pH 5 (vert), 6 (jaune), 7 (rouge) et 8 (violet).                                                                                                                                                                                                                                                    | 181 |
| <b>Figure IV-9 :</b> Chromatogrammes DAD à 280 nm (marron) et à 440 nm (bleu) et chromatogrammes MS (Base Peak Chromatogram) en mode positif (violet) et négatif (orange).                                                                                                                                                                                                                                                                            | 184 |
| <b>Figure IV-10 :</b> Structures de la protosappanine B et de l'hématoxylol B et principales fragmentations de la protosappanine B d'après [26].                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 185 |
| <b>Figure IV-11 :</b> Chromatogrammes correspondant à l'extraction de l'ion 301,0634 en MS <sup>+</sup> et chromatogrammes UV à 450 nm dans la zone d'intérêt pour l'extrait frais (vert) et le même extrait analysé J+1 (marron).                                                                                                                                                                                                                    | 186 |
| <b>Figure IV-12 :</b> Spectre d'absorption (300-600 nm) et absorbance au $\lambda_{max}$ (440 nm) des extraits eau (bleu), éthanol (orange) et acétate d'éthyle (vert) à J0, J2 et J48.                                                                                                                                                                                                                                                               | 187 |
| <b>Figure IV-13 :</b> Evolution de l'absorbance des extraits obtenus par UAE (jaune) et sous agitation (bleu).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 189 |
| <b>Figure IV-14 :</b> Evolution de l'absorbance à 440 nm (à gauche) et de la perte d'absorbance (à droite) des extraits obtenus dans l'eau, l'acide ascorbique à 1 mM et l'acide ascorbique à 0,1 mM à T0 et après 2h (T2), 21 h (T21) et 47h (T47). Toutes les extractions ont été réalisées en triplicats et les extraits ont été déposés en triplicats (n = 3 x 3).                                                                                | 191 |
| <b>Figure IV-15 :</b> Absorbance à 440 nm à T0 (à gauche) et perte d'absorbance après 2 h (T2), 21 h (T21) et 47 h (T47) (à droite) des extraits obtenus dans l'eau et les solutions de standards à 4 mg/mL. Toutes les extractions ont été réalisées en triplicats et les extraits ont été déposés en triplicats (n = 3 x 3).                                                                                                                        | 193 |
| <b>Figure IV-16 :</b> Structures des cyclodextrines utilisées pour l'encapsulation de l'extrait de campêche.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 194 |
| <b>Figure IV-17 :</b> Absorbance à 440 nm à T0 (à gauche) et perte d'absorbance après 4h30 (T4,5) et 21 h (T21) (à droite) des extraits obtenus dans l'eau et les solutions de cyclodextrines. Toutes les extractions ont été réalisées en triplicats et les extraits ont été déposés en triplicats (n = 3 x 3).                                                                                                                                      | 195 |
| <b>Figure IV-18 :</b> Absorbance à 440 nm à T0 (à gauche) et perte d'absorbance après 3h (T3) et 24 h (T24) (à droite) des extraits obtenus dans l'eau et la solution d'HP- $\beta$ -CD. Toutes les extractions ont été réalisées en triplicats et les extraits ont été déposés en triplicats (n = 3 x 3).                                                                                                                                            | 197 |
| <b>Figure IV-19 :</b> Chromatogrammes à 280 nm et 440 nm des extraits réalisés dans l'eau (bleu) et l'HP- $\beta$ -CD (violet).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 198 |
| <b>Figure IV-20 :</b> Absorbance à 440 nm des extraits réalisés dans l'eau et dans les solutions de LGH et de PMH contenant 10 à 40% d'eau mesurée à T0 et après 1 h (T1) et 18 h (T18). Toutes les extractions ont été réalisées en triplicats et les extraits ont été déposés en triplicats (n = 3 x 3).                                                                                                                                            | 199 |

### Chapitre V

|                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure V-1 :</b> Activité antioxydante mesurée par le test FRAP (bleu) et CUPRAC (orange). L'activité de l'extrait de garance à 5 mg/mL (G5) est comparée à l'activité du trolox, utilisé comme référence à 0,5 mg/mL (T0,5), 0,3 mg/mL (T0,3) et 0,1 mg/mL (T0,1). | 206 |
| <b>Figure V-2 :</b> Activité antioxydante du trolox utilisé comme référence à 1 mg/mL (T1) et 0,25 mg/mL (T0,25) et de l'extrait de campêche préparé à 0,5 mg/mL (C0,5) et 0,25 mg/mL (C0,25).                                                                         | 208 |

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure V-3 :</b> Plaque HR-CCM de l'extrait de campêche et de l'hématoxyline après élution et de l'extrait de campêche après révélation par le DPPH. Les visualisations ont été réalisées dans le visible. Phase stationnaire : plaques HPTLC gel de silice 60 F <sub>254</sub> . Phase éluante : acétate d'éthyle/eau/acide formique/acide acétique (100/27/11/11). ..... | 209 |
| <b>Figure V-4 :</b> Spectre d'absorbance (250-450 nm) de l'octinoxate (bleu) et de l'avobenzone (vert). La zone des UV-B (290-320 nm) est affichée en jaune et celle UV-A (320-400 nm) est affichée en orange.....                                                                                                                                                            | 211 |
| <b>Figure V-5 :</b> Spectre d'absorbance (250-600 nm) des solutions d'octinoxate et d'avobenzone (15 µg/mL et des extraits de garance (0,5 mg/mL) en rose, de roucou (1 mg/mL) en orange et de campêche (0,1 mg/mL) en violet. ....                                                                                                                                           | 212 |
| <b>Figure V-6 :</b> Photographie du shampoing référence contenant 0,2% de pigment minéral et du shampoing préparé avec 0,2% d'extrait de garance. ....                                                                                                                                                                                                                        | 216 |
| <b>Figure V-7 :</b> Photographie et image microscopique à un grossissement x10 de la crème blanche. ....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 218 |
| <b>Figure V-8 :</b> Photographie et image microscopique à un grossissement x10 de la crème enrichie en extrait de roucou. ....                                                                                                                                                                                                                                                | 219 |
| <b>Figure V-9 :</b> Spectre d'absorption (350-650 nm) des extraits de garance (en haut) et de roucou (en bas) obtenus par des extractions de 10 min (ton clair), 30 min (ton moyen) et 60 min (ton foncé) dans des solutions de décyl glucoside à 5% (bleu) et 1% (vert) et spectre d'absorption d'une solution de décyl glucoside à 5% (gris). ....                          | 221 |
| <b>Figure V-10 :</b> Photographies des shampoings réalisés avec 1% de poudre de plantes (en haut), avec de gauche à droite la garance, le roucou et le campêche. ....                                                                                                                                                                                                         | 223 |
| <b>Figure V-11 :</b> Evolution des paramètres L*a*b* des formulations enrichies en poudre de garance (haut), roucou (milieu) et campêche (bas) et Delta E calculé entre chaque mesure.....                                                                                                                                                                                    | 226 |
| <b>Figure V-12 :</b> Photographie et image microscopique à un grossissement x10 de la crème enrichie en poudre de roucou. L'image microscopique au même grossissement de la crème blanche est représentée pour référence.....                                                                                                                                                 | 228 |
| <b>Figure V-13 :</b> Représentations de la crème enrichie en poudre de roucou formulée par ultrasons. A : photographie juste après la réalisation de la crème, B : image microscopique à un grossissement x10 de la crème enrichie et de la crème blanche pour référence, C : photographie de la crème après centrifugation lors des tests de stabilité. ....                 | 229 |

# Liste des tableaux

## Chapitre I

**Tableau I-1 :** Colorants végétaux autorisés en cosmétique et exemples de plantes tinctoriales référencées dans la base de données COSMILE. .... 48

**Tableau I-2 :** Comparaison de l'eau à des solvants classiques d'extraction (méthanol, acétone, acétate d'éthyle, heptane) et à trois solvants verts (éthanol, glycérol, 1,3-propanediol) basée sur les guides de sélection de solvants de GSK, CHEM21 et Sanofi ..... 56

## Chapitre II

**Tableau II-1 :** Classification de la garance des teinturiers selon la classification APG IV (classification botanique des angiospermes établie par l'Angiosperm Phylogeny Group en 2016)..... 87

**Tableau II-2 :** Anthraquinones décrites dans la garance des teinturiers. .... 90

**Tableau II-3 :** Flavonoïdes et acides cinnamiques décrits dans la garance des teinturiers..... 92

**Tableau II-4 :** Analyse de variance (ANOVA) du modèle quadratique. .... 100

**Tableau II-5 :** Comparaison des conditions d'extraction des méthodes décrites..... 109

**Tableau II-6 :** Dosage de Folin-Ciocalteu de l'alizarine, de la rutine et de l'acide chlorogénique..... 114

**Tableau II-7 :** Caractérisation de l'extrait optimal par UHPLC-DAD-HRMS/MS..... 121

## Chapitre III

**Tableau III-1 :** Classification du rocouyer selon la classification APG IV. .... 129

**Tableau III-2 :** Résumé de la composition des huiles végétales déterminée par SFC-MS et ECN des triglycérides détectés..... 140

**Tableau III-3 :** Paramètres physico-chimiques mesurés pour chaque huile ..... 142

**Tableau III-4 :** Facteurs et niveaux utilisés dans le plan d'expériences. .... 145

**Tableau III-5 :** Conditions d'extraction et résultats des analyses réalisées sur les extraits du plan d'expériences..... 146

**Tableau III-6 :** Caractérisation de la phase eau de l'extrait optimal par UHPLC-DAD-HRMS/MS. .... 158

**Tableau III-7 :** Composés volatils identifiés dans l'extrait optimal ..... 164

## Chapitre IV

**Tableau IV-1 :** Classification du campêche selon la classification APG IV..... 169

**Tableau IV-2 :** Coefficients d'extinction molaires de l'hématéine dans l'eau déterminés par Bettinger et Zimmermann [439]..... 180

## Chapitre V

**Tableau V-1 :** Composition de la crème. .... 217

**Tableau V-2 :** Coordonnées  $L^*a^*b^*$  et RVB des shampoings Terre de Couleur réalisés avec l'extrait de garance ou les poudres de garance, roucou ou campêche et couleur décrite par ces paramètres. ... 223

**Tableau V-3 :** Composition de la crème enrichie en poudre de roucou. .... 227

## Annexes

**Tableau A-1 :** Liste des ingrédients cosmétiques utilisés dans les formules et de leurs fournisseurs ..... 241

**Tableau A-2 :** Gradient d'élution pour les extraits de garance ..... 251

**Tableau A-3 :** Gradient d'élution pour les extraits de campêche..... 252

**Tableau A-4 :** Valeurs de  $EE \times I$  [28]. .... 262

**Tableau A-5 :** Formulation du shampoing de Terre de Couleur. .... 263

# Introduction générale

## INTRODUCTION GENERALE

Les colorants végétaux forment une famille hétérogène de composés, reliés par leur capacité à absorber la lumière dans le domaine du visible. Certains d'entre eux sont utilisés depuis des millénaires pour colorer tissus, nourriture, cheveux et peau. Délaissés au profit des colorants de synthèse depuis le milieu du XXe siècle, pour des raisons de coût, d'intensité et de variété de couleur et de stabilité, les colorants végétaux sont aujourd'hui à nouveau mis en avant dans différentes industries. En effet, ils sont considérés comme moins dangereux pour l'homme et pour l'environnement, des aspects particulièrement appréciés actuellement dans l'industrie cosmétique.

Pour utiliser les colorants végétaux en formulation cosmétique, il est nécessaire de s'intéresser à leur couleur et à leur stabilité, mais aussi à leur polarité, qui déterminera la méthode d'extraction la plus adaptée. La composition globale de l'organe végétal dans lequel on les retrouve est aussi à considérer, puisque c'est généralement l'extrait végétal qui est valorisé et non une molécule isolée. La présence d'autres composés, colorés ou non, peut impacter la couleur de l'extrait (notamment par des phénomènes de co-pigmentation), sa stabilité et son activité biologique. Les extraits végétaux ont en cela un intérêt certain par rapport aux molécules synthétiques, puisque leur richesse en molécules variées leur confère généralement plusieurs activités biologiques pouvant être valorisées en cosmétique, comme les activités antioxydante, anti-microbienne, anti-inflammatoire ou anti-UV.

Dans l'objectif de développer des ingrédients à faible impact environnemental, le développement de méthodes d'éco-extraction est un enjeu actuel dans le monde de la recherche comme dans celui de l'entreprise. L'éco-extraction est un concept défini en 2012 par Chemat *et al.* qui comporte 6 axes majeurs, inspirés notamment des 12 principes de la chimie verte. Ainsi, le procédé global est pensé de manière éco-responsable, depuis le choix de la plante jusqu'à l'obtention de l'extrait et à la revalorisation des co-produits, avec une attention particulière sur le choix du solvant et de la méthode d'extraction afin de diminuer le nombre d'étapes, ainsi que la consommation de solvant et d'énergie.

Cette thèse est issue de la collaboration entre l'entreprise cosmétique Terre de Couleur et l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) dans le cadre du projet Eau Photonisée et Innovations Cosmétiques (EPIC). Le projet EPIC est porté par Terre de Couleur, une entreprise spécialisée dans les produits cosmétiques capillaires naturels, à l'initiative du projet. Il comprend trois autres partenaires, l'entreprise Bio-EC, qui a apporté son expertise sur les tests d'activité des produits cosmétiques, le laboratoire Interfaces, Confinement, Matériaux et

## INTRODUCTION GENERALE

Nanostructures (ICMN, UMR 7374) qui a étudié les modifications physico-chimiques de l'eau provoquées par un procédé dit de « photonisation » basé sur la lumière et enfin l'ICOA, à travers cette thèse. L'objectif initial de la thèse était de comparer l'eau photonisée à l'eau non photonisée dans un contexte d'extraction. Pour cela, nous avons mené plusieurs études de comparaison d'extraction, de resolubilisation et même de formulation des extraits obtenus. Cependant, ces essais n'ont pas permis d'observer des différences significatives et répétables, ce qui était en partie lié à une méconnaissance des effets de la photonisation sur l'eau et du comportement de cette eau photonisée. L'impact du procédé de photonisation sur la capacité d'extraction de l'eau pourrait être à nouveau évalué car les travaux de l'ICMN ont apporté une meilleure compréhension de la photonisation et de ses effets sur l'eau.

Les objectifs de la thèse et le travail de recherche présenté dans ce manuscrit ont donc été dédiés au développement de méthodes d'éco-extraction en utilisant l'eau, qui est au centre du projet collaboratif, comme solvant d'extraction. Les extraits obtenus ont été étudiés, en termes de couleur, de composition, d'activité, mais aussi dans certains cas, de stabilité. Diverses voies de transfert vers la formulation ont été étudiées afin de réduire le nombre d'étapes du procédé global et ainsi de diminuer la consommation d'eau et d'énergie.

Le premier chapitre se concentre dans un premier temps sur une étude bibliographique des colorants végétaux. Leur classification et leurs principales caractéristiques physico-chimiques ont ainsi été détaillées. Leur potentiel cosmétique, notamment via une sélection d'activités d'intérêt a aussi été brièvement décrit. Ce chapitre est aussi dédié à une étude bibliographique sur l'utilisation de l'eau en tant que solvant d'extraction. Les définitions de l'éco-extraction et des solvants verts y ont alors été détaillées, ainsi que la place de l'eau dans ces domaines. La capacité de l'eau à extraire les différents types de composés végétaux, notamment en fonction de leur polarité a aussi été décrite. Enfin, les méthodes d'extraction décrites dans la littérature pour l'extraction des colorants végétaux à l'eau ont été étudiées afin d'introduire la stratégie adoptée pour les travaux de cette thèse.

Le second chapitre porte sur l'extraction à l'eau de composés moyennement polaires. Pour cela, l'optimisation par plan d'expériences de l'extraction assistée par micro-onde (MAE) des anthraquinones de la garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.) a été présentée. La comparaison entre la méthode optimisée et diverses méthodes d'extraction conventionnelles avec un solvant hydroalcoolique (chauffage sous agitation et soxhlet), d'éco-extraction à l'eau (extraction assistée par ultrasons ou extraction par liquide pressurisé), ou par MAE avec

## INTRODUCTION GENERALE

d'autres solvants adaptés à l'extraction des anthraquinones a aussi été présentée. Enfin, la composition de l'extrait, déterminée par diverses méthodes de détection et de dosage des principales familles moléculaires, puis par une analyse UHPLC-HRMS/MS, a été présentée.

Le troisième chapitre est dédié à l'extraction simultanée d'un colorant liposoluble et d'autres molécules d'intérêt cosmétique plus polaires à l'aide d'un solvant biphasique composé d'eau et d'huile végétale. La plante étudiée dans ce chapitre est le roucou (*Bixa orellana* L.). L'optimisation de la méthode d'extraction assistée par ultrasons, mais aussi l'impact du choix de l'huile végétale sur la composition et l'activité antioxydante des deux phases de l'extrait ont été présentés. Pour cela, la composition et certaines propriétés physico-chimiques des huiles sélectionnées ont été étudiées. Enfin, la composition des deux phases de l'extrait, déterminée par UHPLC-HRMS/MS, ainsi que le dosage de la bixine, le colorant principal de la plante, ont été présentés.

Le quatrième chapitre est dédié à l'extraction et à l'étude de la stabilité d'un colorant hydrosoluble, mais instable en solution aqueuse. Ainsi, l'extraction assistée par ultrasons du campêche (*Haematoxylum campechianum* L.) a été décrite. L'étude de la composition, de la couleur et de la stabilité de l'extrait a aussi été présentée brièvement. Enfin, plusieurs méthodes de stabilisation de l'extrait ont été étudiées et comparées.

Le cinquième chapitre se concentre sur la valorisation cosmétique des extraits aqueux développés précédemment. Dans un premier temps, leur activité antioxydante et leur capacité à filtrer les rayonnements ultraviolets ont été présentées. Ensuite, la formulation des extraits secs et des extraits bruts encore en solution a été discutée. Enfin, diverses méthodes permettant d'allier extraction et formulation ont été développées afin d'améliorer la qualité des produits.

Enfin, les conclusions tirées de ces travaux, ainsi que les perspectives sur leur continuité en termes de recherche et de valorisation par l'entreprise partenaire ont été exposées.

# Chapitre I

## L'éco-extraction à l'eau des colorants végétaux

### I. Introduction

Les colorants et pigments désignent des substances perçues comme colorées par l'œil humain. Les deux termes diffèrent par le comportement de la substance : un colorant est soluble dans le milieu dans lequel on l'utilise, tandis qu'un pigment est insoluble [1,2]. La couleur des colorants est due à la présence d'un chromophore, une structure moléculaire comprenant généralement des doubles liaisons conjuguées ou un complexe de coordination avec un métal [2,3]. Le chromophore peut absorber l'énergie lumineuse par l'excitation d'un électron et son passage d'une orbitale de faible énergie vers une orbitale de plus haute énergie. Ce phénomène va se traduire par l'absorption de certaines gammes de longueurs d'onde du spectre visible. Le spectre visible est la partie du spectre électromagnétique que l'œil humain est capable de percevoir. Il se situe entre 400 et 800 nm (Figure I-1). L'énergie lumineuse qui n'est pas absorbée par le colorant est celle qui est perçue par l'œil humain [2,4]. Par exemple, la chlorophylle, dont les maxima d'absorbance se situent autour de 430 nm (bleu) et 660 nm (rouge), apparaît verte, tandis que le  $\beta$ -carotène, qui absorbe principalement entre 400 et 500 nm (bleu-vert), apparaît orange.

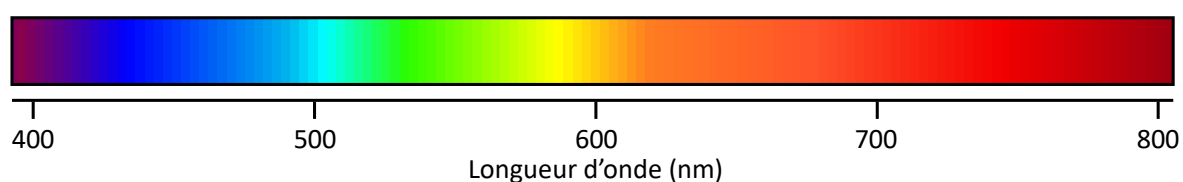


**Figure I-1:** Spectre visible

Les plantes sont capables de synthétiser de nombreuses molécules, généralement séparées en deux groupes : les métabolites primaires et les métabolites spécialisés. Les métabolites primaires sont ubiquitaires et indispensables au développement de la plante. Les principaux sont les sucres, les lipides et les acides aminés. Les métabolites spécialisés, aussi appelés métabolites secondaires, sont présents en quantités plus faibles dans les plantes et ont des fonctions qui ne sont pas directement liées à la survie de la plante. Ils peuvent par exemple permettre à la plante de se défendre contre les agressions extérieures, ou attirer les pollinisateurs.

L'utilité des colorants pour la plante est parfois liée à leur capacité d'absorption de la lumière, notamment dans le cas des chlorophylles qui permettent la photosynthèse, des caroténoïdes qui protègent les cellules contre les rayonnements ultraviolets ou des colorants présents dans les fleurs qui permettent d'attirer les pollinisateurs [5]. Cependant, ils ont souvent d'autres

## CHAPITRE I

utilités pour la plante liées à leurs activités biologiques, notamment antioxydante, antibactérienne ou antifongique [2,5]. Ainsi, les colorants végétaux forment un groupe hétérogène, dont les représentants peuvent être classés parmi les métabolites primaires ou spécialisés appartenant à diverses familles moléculaires [5,6].

En raison de leur couleur, mais aussi parfois de leurs activités, les colorants végétaux sont extraits et utilisés depuis plusieurs millénaires par l'Homme pour des usages cosmétiques, textiles ou alimentaires [7,8]. Leur usage est resté répandu jusqu'au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, lorsque la découverte de méthodes de synthèse de colorants a permis l'essor des molécules de synthèse, moins coûteuses et à la couleur souvent plus intense et plus stable [8,9]. Cependant, depuis quelques décennies, les consommateurs et les industriels de la cosmétique se tournent à nouveau vers les colorants naturels, jugés moins délétères pour l'environnement et la santé humaine [4,6,9]. En effet, les colorants végétaux, ainsi que les extraits végétaux riches en colorants peuvent être utilisés pour remplacer ou diminuer la concentration en ingrédients synthétiques des formulations, que ce soient les colorants, les conservateurs ou les actifs [1,2].

Cependant, les colorants végétaux sont souvent présents en faible quantité et en fonction de leur famille moléculaire, ils ont des structures et donc des polarités variées. De plus, un grand nombre d'entre eux est peu stable, résultant en une diminution ou une modification de la couleur au cours du temps [9].

Pour les valoriser, il est donc nécessaire de développer des procédés durables, c'est-à-dire efficaces et respectueux de l'environnement et de la santé, tout en limitant l'impact économique. L'étape d'extraction est cruciale pour le développement de produits finaux plus éco-responsables [6,10]. En effet, en fonction du choix de la plante, du solvant, de la méthode d'extraction et du traitement de l'extrait post-extraction, l'impact environnemental, la qualité de l'extrait final et le coût de production peuvent varier. L'éco-extraction est un concept décrit en 2012 par Chemat *et al.* dans le but de développer des méthodes d'extraction plus durables et d'obtenir des éco-extraits de haute qualité, non dénaturés, biodégradables et sans contaminants [11]. L'un des six principes de l'éco-extraction est relatif au choix du solvant d'extraction. L'eau est considérée comme un des solvants les plus verts car elle est accessible, non toxique, non polluante et peut être manipulée sans risque [11,12]. Cependant, l'eau est un solvant polaire, seulement capable d'extraire les molécules hydrosolubles par des méthodes d'extraction conventionnelles. L'utilisation de certaines méthodes d'éco-extraction

## CHAPITRE I

innovantes permet de diminuer la polarité de l'eau et d'accéder à une plus grande gamme de molécules, mais pour d'autres molécules plus apolaires, il peut être nécessaire d'ajouter des adjuvants ou des co-solvants à l'eau.

La première partie de ce chapitre est consacrée à la description des principaux colorants issus des plantes supérieures, classés en fonction de leurs familles moléculaires. Le potentiel cosmétique passé et présent de ces composés, lié à leur couleur, mais aussi à leurs activités biologiques est brièvement décrit. La seconde partie du chapitre se concentre sur l'éco-extraction à l'eau : ses intérêts, mais aussi les difficultés pouvant en découler. Cette partie est clôturée par un état de l'art sur les méthodes d'extraction des colorants végétaux à l'eau décrites dans la littérature. Ce bilan bibliographique permet d'identifier les principales méthodes d'extraction à l'eau et les principales familles de colorants naturels accessibles par ces méthodes. Il conduit ainsi à la description des objectifs de la thèse ; le développement de méthodes d'éco-extraction à l'eau afin d'élargir le panel de molécules accessibles et de produire des éco-extraits formulables en cosmétique.

## II. Les colorants végétaux

### A. Classification des colorants issus des plantes supérieures

Les colorants végétaux sont généralement classés selon leur couleur, leur structure ou leur solubilité [6] (Figure I-2).

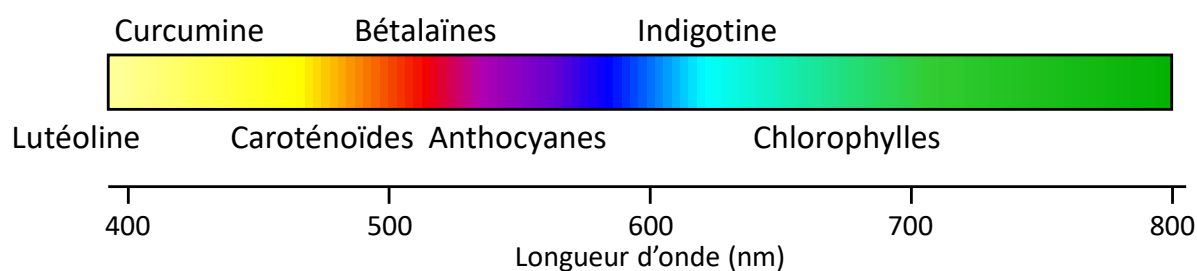


**Figure I-2** : Sélection de colorants végétaux de couleurs variées classés en fonction de leur longueur d'onde au maximum d'absorption et spectre des couleurs perçues par l'œil.

Les structures des colorants végétaux sont très variées. On y retrouve les chlorophylles, mais aussi plusieurs types de composés phénoliques incluant les flavonoïdes (notamment les anthocyanes), les quinones et les curcuminoïdes, ainsi que des polymères de composés phénoliques comme les tanins. Les colorants végétaux comptent aussi certains terpènes, incluant notamment, les caroténoïdes ainsi que certains composés azotés comme les bétaïnes, la berbérine et l'indigo.

# CHAPITRE I

## 1. Chlorophylles

Les chlorophylles sont les colorants végétaux les plus largement distribués dans la nature [2,13]. On les retrouve dans le chloroplaste des cellules végétales photosynthétiques. Elles sont ainsi présentes dans la plupart des tissus verts des plantes [13]. Ce sont des métabolites essentiels à la croissance de la plupart des angiospermes de par leur rôle dans la photosynthèse [2].

Le squelette de base des chlorophylles est la phorbine, un macrocycle formé de 4 noyaux pyrroles numérotés I, II, III et IV avec une cyclopentanone sur le pyrrole III. Un atome de magnésium est fixé au centre de ce tétrapyrrole et un alcool mono-insaturé à 20 carbones, le phytol, est estérifié au pyrrole IV (Figure I-3) [2,13,14]. Les chlorophylles sont classées en quatre familles. Les chlorophylles a (bleues-vertes) et b (jaunes-vertes) sont les plus abondantes chez les plantes supérieures. Elles se différencient par le groupement en position 7 : un méthyle dans la chlorophylle a et un aldéhyde dans la chlorophylle b (Figure I-3) [14]. Les chlorophylles c et d sont plus généralement retrouvées dans les algues [2].

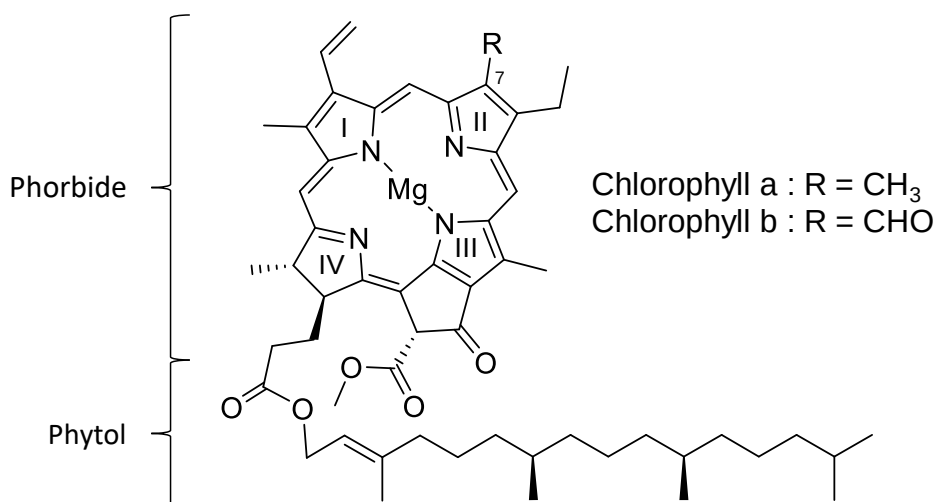


**Figure I-3 :** Structure des chlorophylles.

Les chlorophylles sont des colorants peu stables, sensibles à l'exposition à la lumière et à l'oxygène, ainsi qu'au pH et aux oxydants [2,14]. L'hydrolyse acide de la chlorophylle libère le magnésium et produit la phéophytine, un dérivé de couleur marron-olive. La perte du groupement phytol, notamment sous l'effet d'une base ou par réaction enzymatique, donne la chlorophyllide, un composé vert. La perte consécutive du magnésium et du phytol donne le phéophorbide, de couleur marron-olive [2,13]. Les chlorophylles et phéophytines sont liposolubles, mais les chlorophyllines et phéophorbides sont plus hydrophiles suite à la perte du groupement phytol [2].

## CHAPITRE I

Les chlorophylles naturelles sont peu utilisées comme colorants. En effet, leurs analogues hémi-synthétiques, leurs dérivés hydrosolubles ou ceux obtenus après chélation métallique leur sont préférés pour des raisons de stabilité de la couleur, de coût de production, de facilité d'utilisation et de force colorante [2]. Les chlorophylles, qu'elles soient naturelles ou non, ont aussi une activité photosensibilisante qui doit être prise en compte avant leur incorporation en cosmétique [15]. Les principales plantes terrestres utilisées comme sources de chlorophylle commerciale sont la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) et l'ortie (*Urtica dioica* L.) [2,13].

### 2. Flavonoïdes, aurones et chalcones

Les flavonoïdes sont la plus grande famille de polyphénols du règne végétal [16]. Ils sont présents dans de nombreuses espèces végétales et sont notamment responsables de la couleur jaune de fleurs comme le cosmos sulfureux (*Cosmos sulphureus* Cav.) ou les gaillardes (*Gaillardia spp.*) [17,18]. Leur précurseur est la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone, à partir de laquelle sont formées les chalcones, les aurones, ainsi que les flavonoïdes (Figure I-4) [6,17,19].

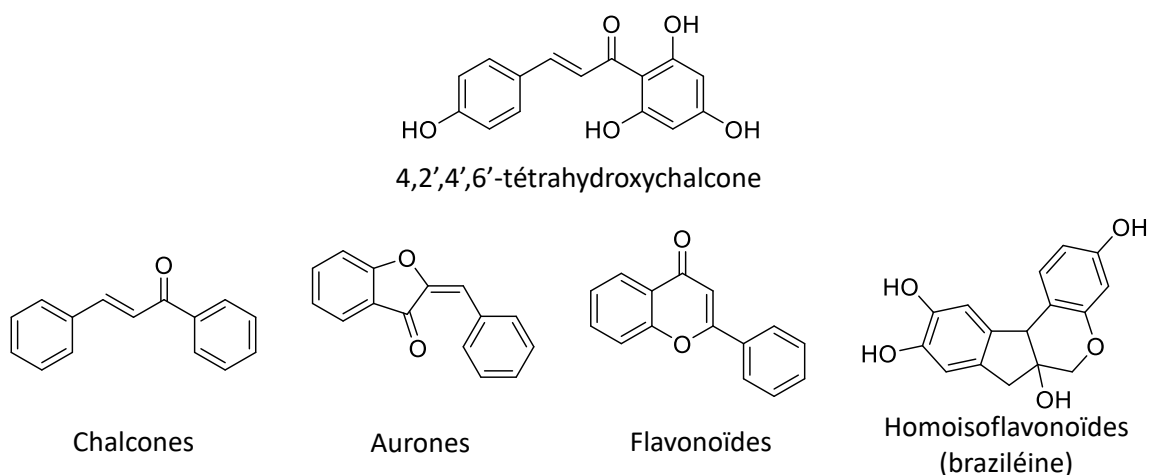


**Figure I-4 :** Squelettes de base des chalcones, aurones, flavonoïdes et homoisflavonoïdes et de leur précurseur.

Parmi les flavonoïdes, on retrouve les flavones, flavonols, isoflavones, flavanones, flavan-3-ols et anthocyanes, dont le squelette de base est la 2-phénylchromone. Ces molécules se différencient par le type et la position de leurs groupements chimiques. Ceux-ci influent sur leur couleur et leur solubilité. Les homoisflavonoïdes dérivent du même précurseur, mais présentent une plus grande variété de structures. Il existe 5 types d'homoisflavonoïdes, mais seuls les homoisflavonoïdes de type braziline sont des colorants (Figure I-4) [6,17,19].

## CHAPITRE I

Les flavonoïdes sont généralement peu solubles dans l'eau sous leur forme non glycosylée. En revanche, les flavonoïdes glycosylés et les colorants issus des familles des anthocyanes et homoisoflavonoïdes sont hydrosolubles [6].

### a. Flavonoïdes

En dehors des anthocyanes, la plupart des flavonoïdes ont une couleur jaune pâle et sont peu utilisés comme colorants [6,9]. Il existe cependant des exceptions, comme le colorant jaune issu du réséda des teinturiers (*Reseda luteola* L.). Longtemps utilisé pour son pouvoir colorant et sa résistance, ce colorant jaune est particulièrement riche en lutéoline, une flavone, sous forme glycosylée ou aglycone [18,20].

Les anthocyanes sont largement distribués dans les plantes et forment le plus grand groupe de colorants hydrosolubles des végétaux [21]. A ce jour, environ 700 anthocyanes ont ainsi été décrites [4,17,22]. On les retrouve principalement dans les fleurs, fruits et feuilles, mais elles peuvent aussi être présentes dans les parties souterraines ou les tiges de quelques plantes [2,17,21]. La couleur de la plupart des fruits et légumes rouges ou violets provient des anthocyanes [4].

Les anthocyanes sont les formes glycosylées des anthocyanidines, dont le squelette de base est l'ion flavylum (Figure I-5) [2,4,21,23,24]. Il existe une vingtaine d'anthocyanidines connues, mais les six principales représentent environ 90% de leurs occurrences dans les plantes. Il s'agit des cyanidines (50%, rouge-violet) , pélargonidines (12%, orange-rouge), péonidines (12%, rouge), delphinidines (12%, bleu-violet), pétunidine (7%, violet) et malvidines (7%, violet) (Figure I-5) [16,17,21,22,24]. Elles se distinguent par leurs hydroxylations et méthoxylations en position 3' ( $R_1$ ) et 5' ( $R_2$ ) sur le cycle B (Figure I-5).

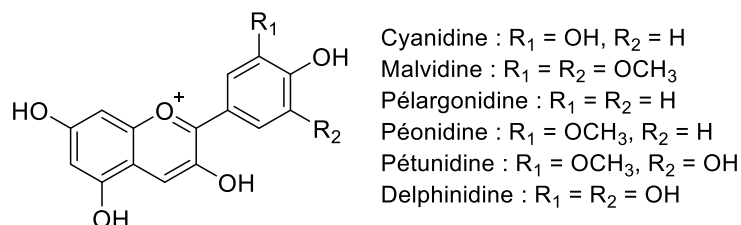


**Figure I-5 :** Structure de l'ion flavylum et groupements différenciant les principales anthocyanes.

Ces différences influent non seulement sur la couleur, mais aussi sur la stabilité des anthocyanes. Les hydroxylations ont un effet hypsochrome (diminution du  $\lambda_{\text{max}}$  qui fait tendre la couleur vers le rouge) et diminuent la stabilité, tandis que les méthoxylations ont un léger effet bathochrome (augmentation du  $\lambda_{\text{max}}$  qui fait tendre la couleur vers le bleu) et

## CHAPITRE I

augmentent la stabilité [2,9,17,23]. Les modifications sur des substituants sucres peuvent aussi impacter la couleur et la stabilité des anthocyanes. En effet, les sucres portés par les anthocyanes sont souvent substitués par des acides aromatiques ou aliphatiques. Les acylations aromatiques ont un effet bathochrome et hyperchrome (augmentation de l'absorbance) tandis que les acylations aliphatiques n'ont pas d'impact sur la couleur. Toutes les acylations améliorent la stabilité de la molécule grâce à un phénomène de stacking intermoléculaire [4,9,17,22]. En effet, les anthocyanes peuvent s'associer entre elles ou avec d'autres molécules (acides phénoliques, flavones, flavonols, alcaloïdes, acides aminés...), alors appelées co-pigments, pour former des complexes stables. Le stacking intermoléculaire a un effet bathochrome et hyperchrome sur la couleur, indépendamment de la couleur du co-pigment utilisé et la stabilité du complexe augmente avec le ratio co-pigment/anthocyane [2,6,9,17,21,22]. Enfin, les cations métalliques  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$  et  $Mg^{2+}$  causent un bleuissement des anthocyanes, observable dans certaines fleurs comme les hortensias (*Hydrangea* spp.), les tulipes (*Tulipa* spp.) ou le bleuet (*Centaurea cyanus* L.) [17].

Les anthocyanes sont sensibles au pH, à la lumière, à l'oxygène, aux pro-oxydants, à l'activité de l'eau et à la température [4,6,9,21–23]. Le pH est un facteur particulièrement impactant à la fois pour la stabilité et la couleur des anthocyanes. En effet, ce sont des diacides de pKa 4 et 7. Leur forme la plus stable est le cation flavylum, majoritaire à pH < 3 (Figure I-6). A pH 3-6, le flavylum est hydraté et donne la forme carbinol pseudo-base incolore. Une augmentation de pH cause alors l'ouverture du cycle vers la forme chalcone jaune pâle. Parallèlement, la forme flavylum est oxydée vers les formes quinoidales violette à pH 6 puis bleue à pH 7 qui sont peu stables et dont la couleur diminue avec le temps (Figure I-6) [2,16,22,23,25].

## CHAPITRE I

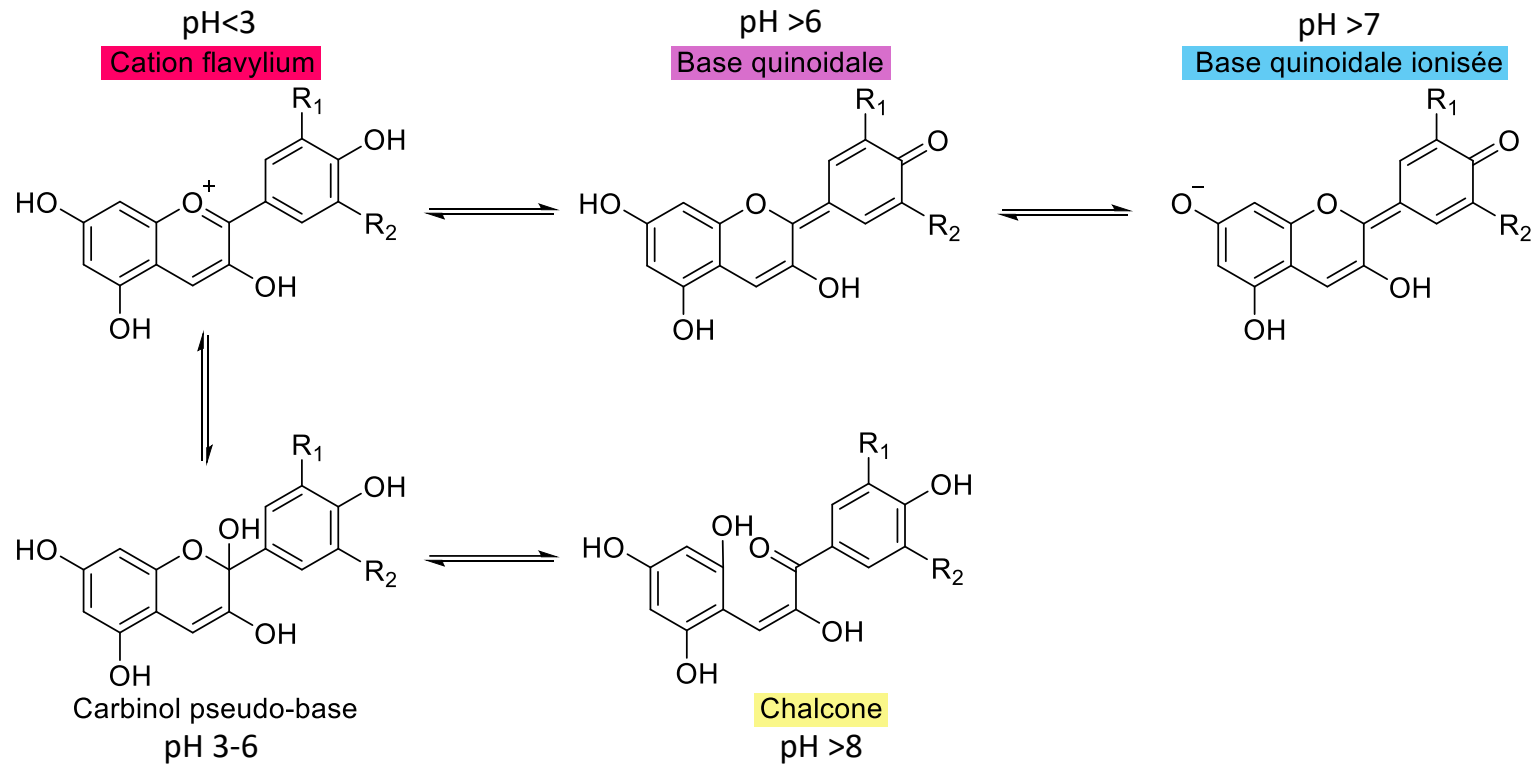


**Figure I-6 :** Voies de dégradation des anthocyanes.

## CHAPITRE I

### b. Homoisoflavonoïdes

Les homoisoflavonoïdes sont obtenus à partir du précurseur des flavonoïdes par l'ajout d'un carbone provenant de la méthionine. Ils sont classés en quatre groupes en fonction de leur squelette de base : protosappanines, caesalpines, brazilines et scillascillines (Figure I-7) [19]. Les colorants principaux de la famille des homoisoflavonoïdes sont la braziléine (Figure I-7) issue du sappan (*Biancaea sappan* L., anciennement *Caesalpinia sappan* L.) et du bois-brésil (*Paubrasilia echinata* (Lam.) Gagnon, H.C.Lima & G.P.Lewis, ou *Caesalpinia echinata* Lam.) et l'hématéine (Figure I-7) issue du campêche (*Haematoxylum campechianum* L.). Ces deux molécules sont des dérivés issus de l'oxydation de composés incolores, respectivement la braziline et l'hématoxyline (Figure I-7). Les homoisoflavonoïdes peuvent aussi former des dimères, qui ont notamment été retrouvés dans des extraits de sappan et de campêche, mais ces composés sont plus rares et moins documentés [19,26].

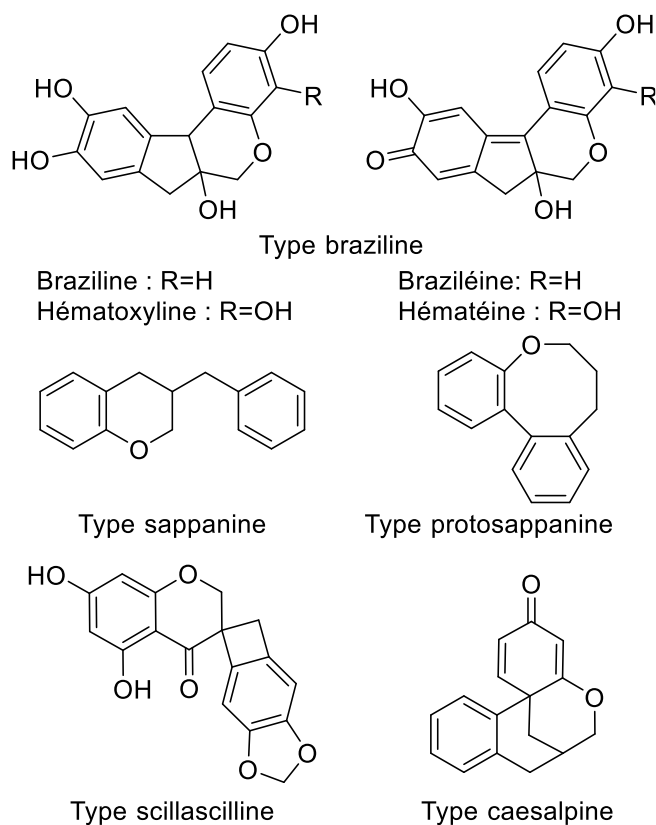


**Figure I-7 :** Structure des principaux homoisoflavonoïdes de type braziline et squelettes de base des autres homoisoflavonoïdes.

La braziléine et l'hématéine sont peu stables en solution. Le pH influence particulièrement la stabilité, notamment la stabilité thermique, mais aussi la couleur de ces molécules [27,28]. La braziléine et l'hématéine sont sous forme neutre et de couleur jaune ou orange à pH acide et sous forme déprotonée et de couleur rouge-violet à pH basique [27].

## c. Aurones, chalcones et autres dérivés de flavonoïdes

Les aurones sont plus rares que les flavonoïdes et donnent une couleur jaune vif à certaines fleurs comme le mufler à grandes fleurs (*Antirrhinum majus* L.) [17]. La plupart des chalcones sont jaune pâle, mais les quinochalcones, des chalcones portant une quinone, ont une couleur jaune ou rouge vif. Ces dernières sont spécifiques du genre *Carthamus*, particulièrement connu pour le carthame des teinturiers (*Carthamus tinctorius* L.). Elles existent sous formes glycosylée ou non et peuvent être dimérisées, comme la carthamine, principal colorant rouge du carthame (Figure I-8) [20].

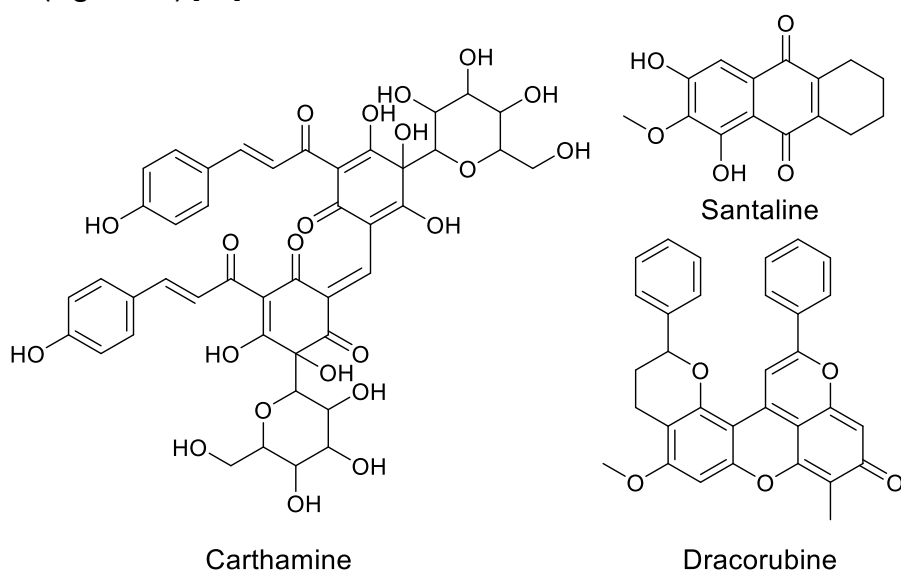


**Figure I-8 :** Structures de la carthamine, de la santaline et de la dracorubine.

Enfin, il existe d'autres colorants rouges reliés aux flavonoïdes par leur structure, qu'on retrouve dans les résines et le bois de certains arbres. Les principaux sont la dracorubine (Figure I-8), issue du sang-dragon, la résine du dragonnier des Canaries (*Dracaena draco* (L) L.) et la santaline (Figure I-8), colorant principal du bois de Santal (*Santalum* spp.) [20].

## 3. Autres composés phénoliques

### a. Curcuminoïdes et phénylphénalénones

Les curcuminoïdes sont des colorants jaunes dont la structure de base est une dicétone appartenant au groupe des diarylheptanoïdes [16]. On les retrouve dans le rhizome des espèces de Curcuma, la plus connue étant *Curcuma longa* L., utilisée pour produire l'épice curcuma [16,29]. Les curcuminoïdes majeurs sont la curcumine, la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine (Figure I-9). Ils peuvent être utilisés comme colorants alimentaires, textiles ou capillaires, seuls ou avec un mordant (une molécule capable de former des liaisons non covalentes avec le colorant et la fibre et ainsi de fixer la couleur) [9,16].

## CHAPITRE I

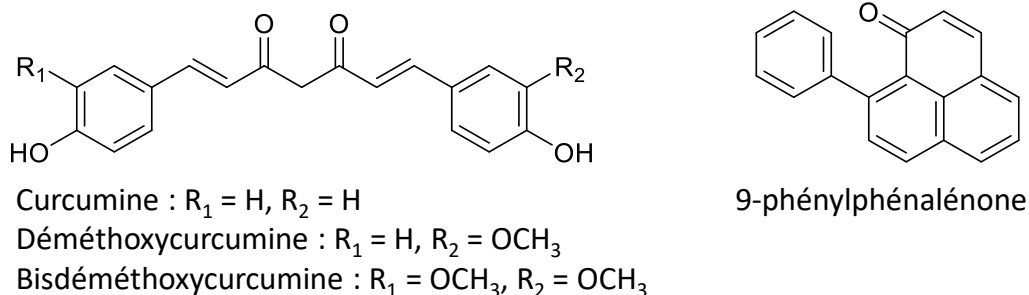


**Figure I-9 :** Structures des principales curcumines et d'une phénylphénalénone.

A pH acide, les curcuminoïdes sont sous forme de cétone. Ils sont alors plutôt liposolubles et stables. A partir d'un pH 8, la forme éolique anionique, plus soluble dans l'eau, mais instable, devient majoritaire [2,9,16]. Les curcuminoïdes sont peu sensibles à l'activité de l'eau ou à la température, mais très sensibles à la lumière [2,9,23].

Les phénylphénalénones sont des phytoalexines antifongiques produites par certaines monocotylédones (Haemodoraceae, Musaceae, Pontederiaceae et Strelitziaceae). Leur structure de base est la phénalénone, une cétone aromatique tricyclique, qui porte un groupement phényle en position 4, 9 ou plus rarement 8 (Figure I-9). Elles sont biosynthétisées à partir de la phénylalanine, en passant par des intermédiaires diarylheptanoïdes [20,30]. Ce sont des colorants généralement rouges, mais aussi jaunes, oranges ou violets dont les sources les plus connues sont les racines, fruits ou feuilles de bananier (*Musa* spp.) et de lachnanthe de Caroline (*Lachnanthes caroliniana* (Lam.) Dandy ou *Lachnanthes tinctoria* Elliott) [20,30]. Les phénylphénalénones sont phototoxiques et ne peuvent donc pas être utilisées dans les produits cosmétiques [30].

### b. Quinones

Les quinones possèdent un squelette de dione cyclique totalement conjugué. Elles sont classées en benzoquinones, qui ne comportent qu'un cycle benzène, naphtoquinones, qui possèdent un second cycle benzène conjugué et anthraquinones qui sont formées de deux cycles benzènes conjugués entourant la dione cyclisée (Figure I-10) [20,22,31]. Enfin, il existe des quinones polymériques, comme l'hypéricine et la pseudo-hypéricine qui donnent leur couleur aux glandes sombres des feuilles de millepertuis (*Hypericum* spp.) (Figure I-10) [20].

## CHAPITRE I

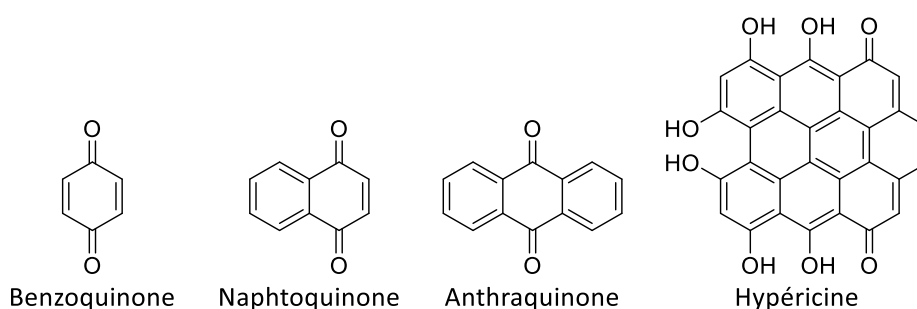


**Figure I-10 :** Squelettes de base des benzoquinones, naphtoquinones et anthraquinones et structure de l'hypéricine.

Les naphtoquinones sont responsables de couleurs allant du rose-violet au marron, tandis que les anthraquinones donnent plutôt du jaune, du rouge ou du orange [9,22]. Ces dernières représentent la plus grande portion de quinones naturelles et peuvent être retrouvées non seulement dans les plantes, mais aussi dans certains champignons, lichens et insectes [9,22].

Les naphtoquinones sont utilisées comme colorants textiles et cosmétiques. Les principales sont la juglone, notamment obtenue à partir de l'écale de noix (*Juglans regia* L.), la lawsone, qu'on trouve dans les feuilles de henné (*Lawsonia inermis* L.) et la shikonine dont la source principale est la racine du grémil des teinturiers (*Lithospermum erythrorhizon* Siebold & Zucc.) [9,16,20,22,24].

Les anthraquinones constituent le plus grand groupe de quinones. Elles sont accumulées sous forme glycosylée dans les rhizomes des plantes de plusieurs familles du règne végétal, particulièrement les Rubiaceae, notamment les garances (*Rubia* spp.) et les Polygonaceae, notamment les rhubarbes (*Rheum* spp.). Les anthraquinones peuvent être classées en deux groupes en fonction de leurs substituants et de leur voie de biosynthèse. Les anthraquinones du type émodine sont formées par la voie de biosynthèse des polycétones et peuvent être substituées sur les deux cycles, alors que les anthraquinones du type alizarine ou rubiadine proviennent de la voie des shikimates et leurs substitutions sont concentrées sur un seul cycle latéral [20,32]. Ces dernières sont principalement présentes chez les Rubiaceae, la plus utilisée étant l'alizarine, extraite de la garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.) [20,31,32].

Les anthraquinones sont plus stables que les autres colorants orangés, notamment face à la lumière [33]. La sensibilité à d'autres facteurs de dégradation comme les températures élevées et le pH varie en fonction des anthraquinones [34]. Leur couleur peut être pH-dépendante. L'alizarine par exemple apparaît jaune sous sa forme neutre, mais devient rouge

## CHAPITRE I

puis violette à pH basique. Ce changement est dû à la déprotonation consécutive des deux hydroxyles [6,16].

### c. Xanthones

Les xanthones sont des colorants jaunes tricycliques retrouvés dans le bois et les racines de certaines Gentinaceae, Hypericaceae, Clusiaceae et Callophyllaceae (Figure I-11). Elles sont aussi produites par certains champignons et lichens [20,35]. Elles sont synthétisées par les plantes via la voie des shikimates (cycle A) et la voie des acétates (cycle B), via des réactions qui diffèrent en fonction des familles de plantes [35].

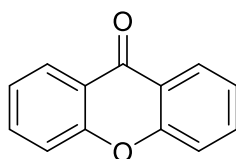


**Figure I-11** : Squelette de base des xanthones.

Les xanthones les plus connues sont les mangostines et garcinones issues du péricarpe du mangoustan (*Garcinia mangostana* L.), un fruit tropical. Dans la littérature, les xanthones ne sont pas valorisées pour leur couleur, mais plutôt pour leur bioactivité, notamment au niveau de la peau pour leurs potentiels antioxydant, anti-inflammatoire et anti-acné [36].

## 4. Polymères de composés phénoliques

### a. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques largement distribués dans le règne végétal. Ils sont classés en deux catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les tanins hydrolysables sont des chaînes formées par des sucres estérifiés avec de l'acide gallique (gallotanins) ou de l'acide hexahydroxydiphénique (ellagitanins) (Figure I-12). Les tanins condensés sont quant à eux des polymères de catéchines ou de leucoanthocyanidines (Figure I-12) [16,37]. Les tanins peuvent être présents en grande quantité dans certaines plantes. Par exemple, les gallotanins et l'acide gallique forment plus de 65% de la composition de la cécidie (ou galle) des feuilles du Sumac de Chine (*Rhus chinensis* Mill.) [16].

Les tanins sont des colorants à mordant, ils nécessitent donc une complexation avec un autre composé, par exemple un ion métallique, pour être utilisés comme colorants. Les tanins hydrolysables sont de couleur jaune pâle, mais leurs complexes avec les ions  $Fe^{2+}$  donnent une couleur bleue-noire stable [16]. Ils peuvent aussi être utilisés à l'inverse comme bio-mordants pour améliorer la résistance au lavage de colorations par la formation de complexes et de

## CHAPITRE I

liaisons hydrogène avec les protéines des fibres et les molécules organiques utilisées comme colorant [16].

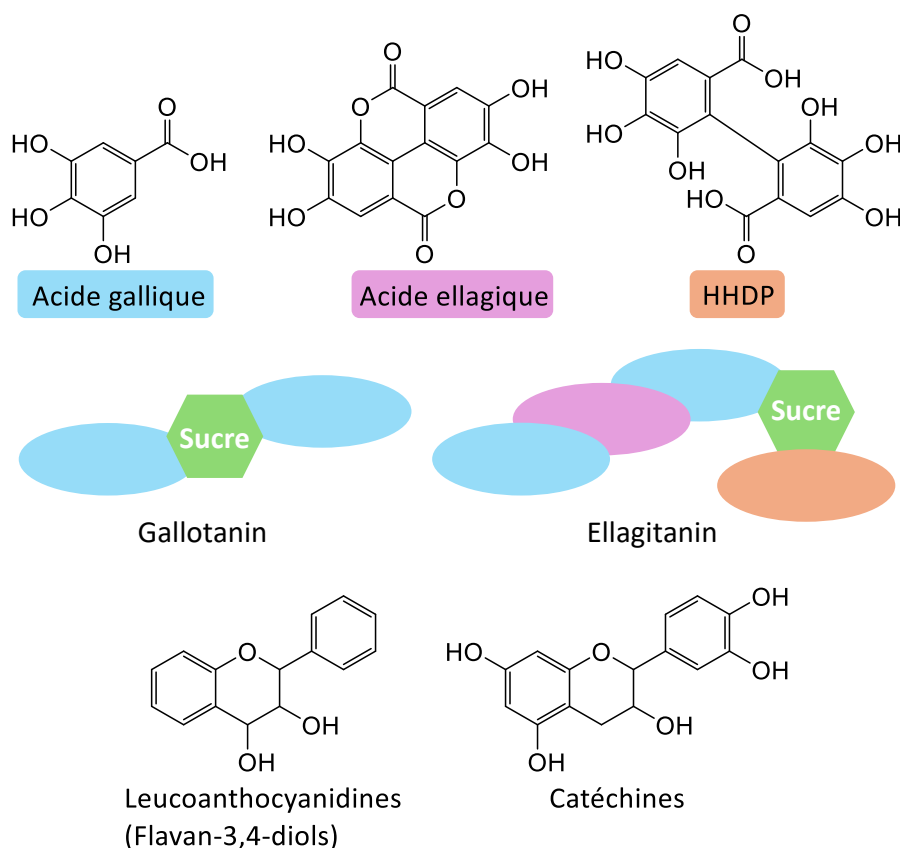


**Figure I-12 :** Structure des unités constitutives des tanins et illustration des structures des tanins hydrolysables.

Le thé noir (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) contient des tanins caractéristiques produits lors de la fermentation du thé, dont la couleur va de l'orange au brun. Ces molécules sont issues de la polymérisation de catéchines et de certains de leurs produits d'oxydation [38,39]. Les théaflavines sont des colorants jaunes-orangés qui dérivent de la benzotropolone [38–40]. Les théacitrines sont des colorants jaunes très minoritaires issus de la dimérisation de deux catéchines suivie de l'ouverture d'un des cycles B et d'un réarrangement sous l'effet de l'oxydation [38,39]. Les théarubigines sont des colorants rouges-bruns qui constituent le plus grand groupe de produits d'oxydation des composés phénoliques du thé noir. Leur formation est cependant encore mal décrite. Les théarubigines proviendraient d'une cascade oxydative entre des produits d'oxydation des catéchines : les théaflavines, les théasinensines, les théanaphtoquinones et les théacitrines [38,41].

### b. Mélanines

Les mélanines végétales sont des polymères de haut poids moléculaire formés par l'oxydation et la polymérisation de composés phénoliques [9,42]. Elles font partie du groupe des

## CHAPITRE I

allomélanines, groupe hétérogène contenant à la fois les mélanines fongiques et végétales [37,42]. Leurs précurseurs et produits de dégradations sont des acides phénoliques comme le catéchol, le 1,8-dihydroxynaphtalène, l'acide protocatéchique, l'acide gallique, l'acide caféique et l'acide chlorogénique (Figure I-13) et contrairement aux mélanines animales (eumélanines et phéomélanines), elles ne contiennent pas d'atome d'azote [42].

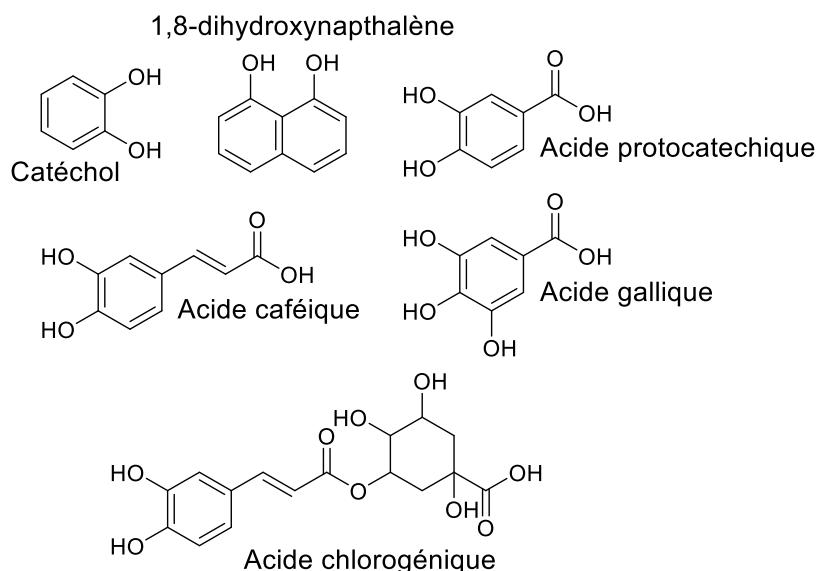


**Figure I-13 :** Structures des principaux précurseurs des mélanines d'origine végétale.

Les mélanines sont des colorants marrons ou noirs, responsables de la coloration sombre de certaines plantes, notamment dans les enveloppes dures de nombreuses graines [37,42]. On en retrouve notamment une forte quantité (15% du contenu total) dans les coques de châtaignes (*Castanea sativa* Mill.) [9]. Les mélanines végétales sont encore peu étudiées et peu valorisées en tant que colorant. Cependant, les mélanines animales sont déjà utilisées en cosmétique, notamment l'eumélanine issue de l'encre de seiche (*Sepia officinalis* L.) [6,9]. Ces colorants ont en effet un intérêt de par leur stabilité, leur capacité d'absorption des rayonnements ultraviolets et leur capacité antioxydante [37,42]. De plus, les mélanines sont présentes dans plusieurs co-produits de l'agriculture comme la coque des graines de tournesol (*Helianthus annuus* L.) [42].

### 5. Terpènes

Les colorants les plus célèbres chez les terpènes sont les caroténoïdes, qui font partie des tétraterpènes [4]. Cependant, ils ne sont pas les seuls colorants de cette famille. Certains monoterpènes, les iridoïdes, peuvent former des complexes colorés avec des acides aminés [43]. De plus, des quinoneméthides dérivées de diterpènes, comme la fuerstione et les parviforones ou de triterpènes comme la tingérone, sont des colorants rouges produits dans

## CHAPITRE I

l'écorce de racines et les feuilles de certaines Lamiaceae [20]. Enfin, certains sesquiterpènes issus des Malvaceae sont des colorants jaune ou rouge, comme le gossypol, un composé toxique présent dans l'huile de graine de coton (*Gossypium* spp.) [20].

### a. Iridoïdes

Les iridoïdes sont une famille de monoterpènes incolores formés de deux cycles cyclopentane et tétrahydrofurane, parmi lesquels on retrouve la génipine et ses dérivés (géniposide et acide géniposidique) (Figure I-14) [43].

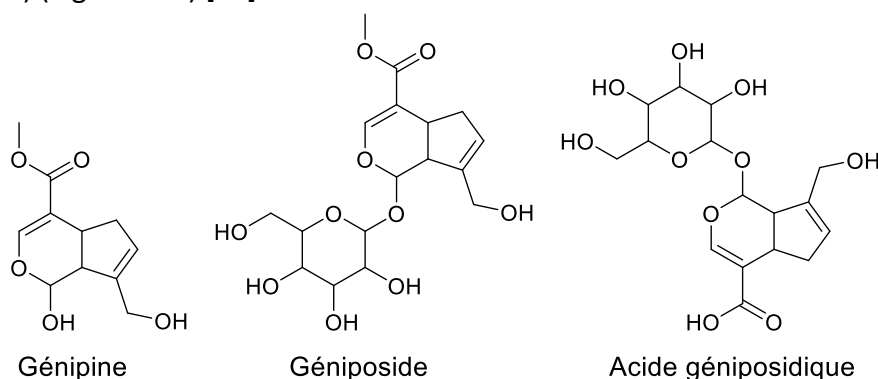


**Figure I-14 :** Structures de la génipine et de ses dérivés.

Ces derniers peuvent former des complexes avec des protéines ou acides aminés par réaction enzymatique. On les retrouve dans les fruits mûrs du jasmin du Cap (*Gardenia jasminoides* J.Ellis) et du jagua (*Genipa americana* L.), deux plantes de la famille des Rubiaceae [6,9,43]. La couleur et la stabilité du complexe dépendent de la température et du pH, mais aussi de l'iridoïde et l'acide aminé formant le complexe. Le colorant obtenu est soluble dans l'eau et sensible à la lumière, au pH et à la température, mais plutôt stable par rapport aux autres colorants naturels [6,9].

### b. Caroténoïdes

Les caroténoïdes forment le plus grand groupe de colorants naturels. Ils sont ubiquitaires dans les chromoplastes et chloroplastes des plantes [17,24]. Ils sont indispensables à la photosynthèse dans laquelle ils jouent un rôle de photoprotection, mais aussi de colorants photosynthétiques accessoires, grâce à leur capacité d'absorption de la lumière dans le domaine des ultraviolets et du visible à des longueurs d'ondes différentes des chlorophylles [2,24]. Ils ont aussi un rôle d'attraction des pollinisateurs et de précurseurs dans la biosynthèse de l'acide abscissique, un régulateur de croissance [2,17]. Ils sont responsables de la couleur jaune, orange ou rouge de nombreuses plantes, mais aussi de champignons et

## CHAPITRE I

de certains animaux. Ces derniers cependant ne sont pas capables de les synthétiser et les obtiennent exclusivement via leur alimentation [2,16,22,24].

Les caroténoïdes sont des tétraterpènes dont le précurseur est le phytoène, formé par la condensation tête-queue de deux unités de diphosphate de digéranyle (GGPP, C<sub>20</sub>) (Figure I-15). Plus de 700 caroténoïdes naturels ont été identifiés. Ils sont classés en carotènes, formés uniquement d'atome de carbone et d'hydrogènes et xanthophylles, qui contiennent aussi des atomes d'oxygène (Figure I-15) [2,4,22,23]. Enfin, les apocaroténoïdes sont des composés issus de la dégradation ou du clivage d'autres caroténoïdes (Figure I-15). Certains sont les principaux colorants des plantes dans lesquelles on les retrouve. C'est le cas de la bixine, présente dans la graine de roucou (*Bixa orellana* L.) et des crocétines et du safranal retrouvés dans les styles du crocus à safran (*Crocus sativus* L.) [17,20].

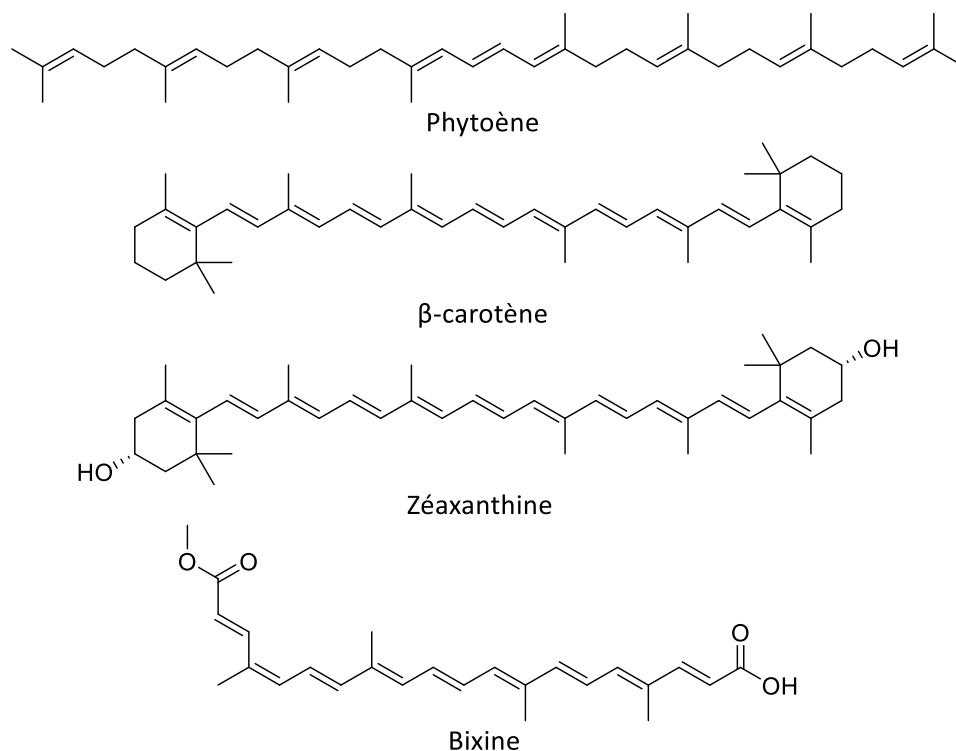


**Figure I-15** : Structures du précurseur des caroténoïdes (phytoène) et d'un représentant des carotènes (β-carotène), des xanthophylles (zéaxanthine) et des apocaroténoïdes (bixine).

Les feuilles de la plupart des végétaux contiennent de la zéaxanthine, de la violaxanthine, de l'antherxanthine et de la lutéine, tandis que les fruits à chair orange contiennent généralement de la β-cryptoxanthine [4,17,22]. Cependant, les caroténoïdes retrouvés dépendent souvent de l'espèce végétale. Par exemple, la couleur rouge de la tomate provient majoritairement du lycopène tandis que celle du piment rouge provient de la capsanthine et de la capsorubine. Généralement, les plantes ne stockent pas de caroténoïdes dans les parties

## CHAPITRE I

souterraines, exception faite des carottes (*Daucus carota* L.) et de la patate douce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), riches en  $\beta$ -carotène [17]. Dans les pétales, on retrouve le plus souvent des xanthophylles, qui leur donnent une couleur jaune. Cependant, certaines espèces accumulent des carotènes dans les fleurs. C'est le cas des plantes du genre *Sandersonia*, riches en  $\beta$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine et zéaxanthine, des chrysanthèmes qui contiennent de la lutéine et ses dérivés, ou encore des adonis, seules plantes terrestres capables de produire de l'asthaxanthine [17].

Les caroténoïdes sont sensibles à l'oxydation causée par différents facteurs tels que la lumière, le pH, la température ou la présence de pro-oxydants. Ils sont généralement retrouvés sous forme *trans*, mais peuvent s'isomériser à la suite de l'exposition aux rayonnements ultraviolets ou à la chaleur. La forme *cis* étant instable, cette réaction mène rapidement à leur dégradation [4,22].

### 6. Composés azotés

#### a. Bétalaïnes

Les bétalaïnes sont des composés azotés dérivés de la tyrosine. Malgré leur proximité structurale avec les alcaloïdes, elles ne sont pas toxiques et on les retrouve notamment dans des produits alimentaires tels que la betterave rouge (*Beta vulgaris* L.), la figue de barbarie (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) et le fruit du dragon (*Selenicereus undatus* (Haw.) D.R.Hunt, aussi connu sous le nom de *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose) [2,44,45]. Elles sont aussi responsables de la couleur de fleurs comme le bougainvilliers (*Bougainvillea* spp.) ou la belle-de-nuit (*Mirabilis jalapa* L.) [44]. Les bétalaïnes sont spécifiques aux Caryophyllales, mais sont absentes des Caryophyllaceae et Molluginaceae [17,23]. Elles ne sont jamais retrouvées dans les mêmes plantes que les anthocyanes, les deux familles étant mutuellement exclusives [17].

Les bétalaïnes sont classées en bétacyanines (rouges-violettes), notamment représentées par la bétanine et sa génine, la bétanidine, et en bétaxanthines (jaunes-oranges), qui comprennent notamment les vulgaxanthines I et II (Figure I-16) [9,17,44]. La différenciation entre les deux groupes est liée à leur biosynthèse. L'acide bétalamique est le précurseur de toutes les bétalaïnes. Il provient de la conversion de la L-DOPA par la DOPA 4,5-dioxygénase [44]. La condensation spontanée de l'acide bétalamique avec le cyclo-DOPA forme les bétacyanines, tandis que les bétaxanthines viennent de sa condensation spontanée avec des

## CHAPITRE I

acides aminés ou imines [17,44]. Les bétacyanines existent sous forme glycosylée, mais aussi sous forme acylée, ce qui améliore leur stabilité [9,45].

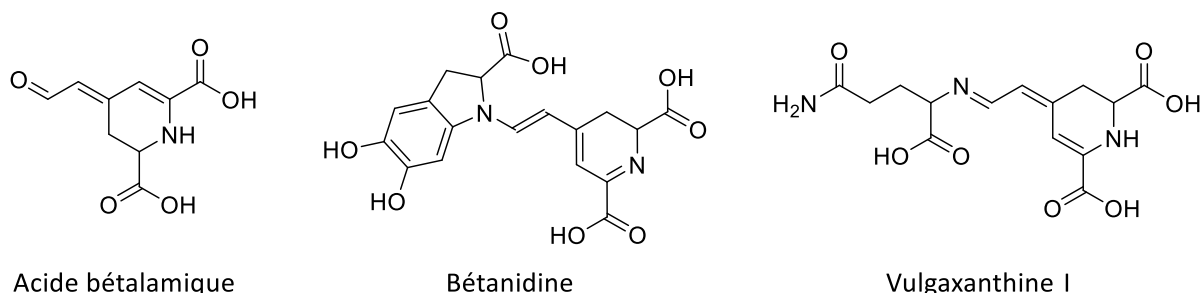


**Figure I-16 :** Structures du précurseur des bétalaïnes (acide bétalamique), ainsi que d'une bétacyanine (bétanidine) et d'une bétaxanthine (vulgaxanthine I).

Les bétalaïnes sont stables dans une gamme de pH comprise entre 3 et 7. Au-delà de ces limites, leur stabilité et leur absorbance dans le visible diminuent. De plus, une diminution du pH en dessous de 3 a un effet hypsochrome et une augmentation au-delà de 7 un effet bathochrome [45]. Elles sont particulièrement sensibles à l'activité de l'eau, à l'oxygène, aux cations métalliques, à la lumière et aux températures supérieures à 50°C [9,17,23,45]. La dégradation des bétalaïnes peut se faire par une réaction de déshydratation, après laquelle la couleur passe de rouge-violet à jaune-orangé, ou bien par la dégradation de la liaison aldimine ou par oxydation, ces deux phénomènes produisant des molécules incolores [23,45].

### b. Indigoïdes

Les indigoïdes forment une famille d'alcaloïdes bis-indoliques dont la couleur va du rouge au bleu. On le retrouve notamment dans les feuilles de la renouée des teinturiers (*Persicaria tinctoria* (Ait.) H.Gross ou *Polygonum tinctorium* W.T.Aiton), de l'indigotier (*Indigofera tinctoria* L.) et du pastel des teinturiers (*Isatis tinctoria* L.) [7]. Leur principaux représentants sont l'indigotine un colorant bleu souvent appelé indigo, et l'indirubine, un colorant rouge (Figure I-17) [7,20,24].

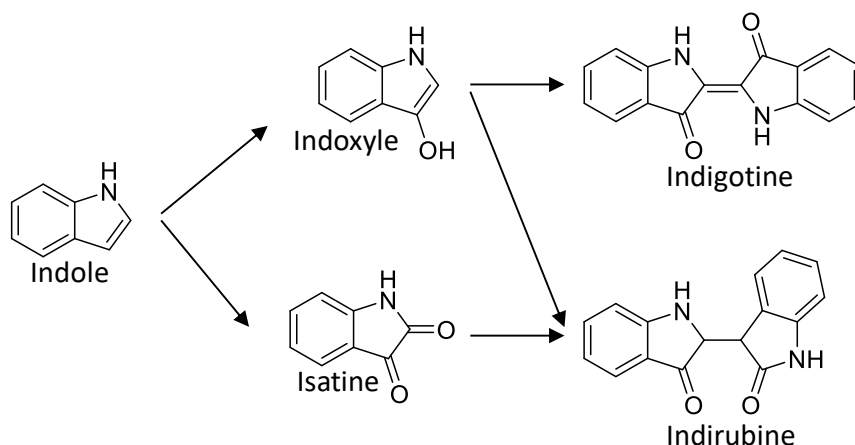


**Figure I-17 :** Schéma simplifié de la biosynthèse de l'indigotine et de l'indirubine.

## CHAPITRE I

Ces molécules ne sont pas directement présentes dans les plantes, mais obtenues lors de l'extraction à la suite de la dimérisation ou de la combinaison de dérivés de l'indole. Ainsi l'indigotine est issu de la dimérisation de l'indoxyle et l'indirubine provient de la liaison entre l'indoxyle et l'isatine (Figure I-17) [7,20]. Elles sont sensibles à la lumière, particulièrement aux rayonnements ultraviolets, mais résistantes à la chaleur [46].

### c. Alcaloïdes benzyloquinolines

Les benzyloquinolines forment une famille d'alcaloïdes hétérogène contenant des composés incolores, mais notables, comme la morphine et la codéine, ainsi que les deux colorants décrits ici : la berbérine et la sanguinarine (Figure I-18) [47]. La biosynthèse de tous ces composés provient de la formation de la (S)-norcaucloirine à partir de deux molécules de tyrosine. La (S)-norcaucloirine est le précurseur à partir duquel les différentes familles de benzyloquinolines se différencient. La berbérine et la sanguinarine sont issues d'un même intermédiaire : la (S)-scoulérine [47].

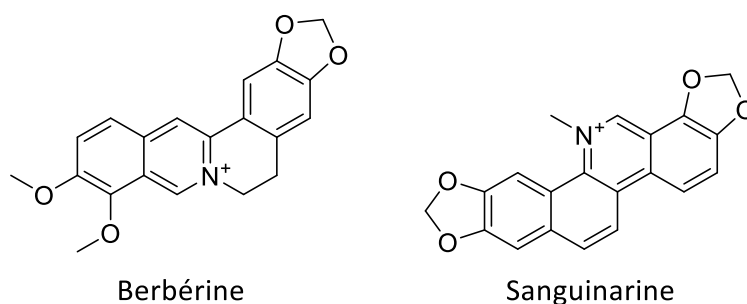


**Figure I-18** : Structures de la berbérine et de la sanguinarine.

La berbérine est un colorant jaune extrait de l'épine-vinette (*Berberis vulgaris* L.) et d'autres espèces de *Berberis* qu'on retrouve aussi notamment dans l'écorce de l'arbre au liège de l'Amour (*Phellodendron amurense* Rupr.) et de l'hydraste du Canada (*Hydrastis canadensis* L.), ainsi que dans le rhizome du coptide chinois (*Coptis chinensis* Franch.) [20,48]. La sanguinarine est un colorant rouge, retrouvé dans les exsudats racinaires et le latex de plusieurs Papaveraceae, notamment la sanguinaire du Canada (*Sanguinaria canadensis* L.) et la chélidoine (*Chelidonium majus* L.) [20,49].

Comme beaucoup d'alcaloïdes, la berbérine et la sanguinarine ont un potentiel pharmacologique, mais aussi de nombreux effets toxiques [48,49]. Elles ne peuvent donc pas être utilisées dans les formulations cosmétiques.

### B. L'usage cosmétique des colorants d'origine végétale

#### 1. Colorants utilisés en cosmétique

##### a. Brève histoire des colorants cosmétiques

L'Homme a commencé très tôt à utiliser des pigments et colorants à des fins rituelles, décoratives ou pratiques. Les plus anciennes traces de production de l'ocre, un pigment minéral, sont vieilles de 100 000 ans [7]. Les pigments et colorants naturels pouvaient alors être issus de sources minérales, végétales ou animales. Les plus anciennes plantes tinctoriales utilisées en cosmétique sont le henné (*Lawsonia inermis* L.) et les garances (*Rubia* spp.) [50,51]. En Egypte antique, des traces de l'utilisation du henné pour colorer les ongles, la peau et les cheveux ont été retrouvées sur des momies datant de 2000 ans avant notre ère [50–52]. Des traces d'extraits de garance ont aussi été retrouvées dans des produits cosmétiques puniques datant de 100 à 400 ans avant notre ère [50,51].

La mauvéine est le premier colorant obtenu par synthèse organique, en 1856 par William Henry Perkin, suite à quoi de nombreux autres colorants synthétiques ont été développés [6,8]. Ils ont alors été privilégiés face aux colorants végétaux du fait de leur capacité tinctoriale, facilité d'utilisation, stabilité, faible coût de revient et variété de couleurs [1,8]. Les colorants de synthèse les plus utilisés à l'échelle industrielle (environ 60% du marché) sont les colorants azoïques. Ces derniers sont caractérisés par la présence d'un groupement azo ( $R-N=N-R'$ ) et comptent une grande variété de structures et donc de couleurs et de polarités [53–55]. D'autres colorants synthétiques sont inspirés des colorants végétaux afin de diminuer les coûts de production et d'améliorer la reproductibilité, la stabilité et l'intensité de la couleur [55]. Cependant, les colorants synthétiques tendent aujourd'hui à être écartés pour des raisons environnementales ou de santé humaine. Leur toxicité ou celle de leurs produits de dégradation ou encore leur nature non-biodégradable sont largement en cause. En effet, plusieurs colorants synthétiques sont allergènes, carcinogènes ou toxiques. Les alternatives naturelles, biodégradables, renouvelables et considérées comme plus saines, sont de plus en plus étudiées en réponse au retrait des colorants synthétiques par les instances, ou simplement pour améliorer l'image du produit auprès du public [1,6,8,9,56].

Un autre avantage des colorants végétaux ou des extraits dans lesquels ils sont inclus, par rapport aux colorants synthétiques, est leur potentiel en tant qu'ingrédients multifonctionnels grâce à leurs activités biologiques (antioxydante, anti-microbienne ou anti-UV par exemple) [6,56]. Leur utilisation peut donc permettre de remplacer ou du moins de diminuer la quantité

## CHAPITRE I

de plusieurs ingrédients controversés (filtres UV, conservateurs ou colorants de synthèse) par un seul ingrédient durable, limitant ainsi les risques sur la santé du consommateur, mais aussi l'impact environnemental du produit final [1,9,57,58].

Cependant, l'utilisation de colorants d'origine végétale est plus coûteuse et complexe que celle des colorants synthétiques et ne dispense pas d'étudier la toxicité du colorant avant de l'inclure dans le produit [8,9]. L'instabilité des colorants végétaux, mais aussi la variation de la couleur liée à la dégradation ou à l'interaction avec d'autres composants du produit, ainsi que la variabilité de la composition des extraits végétaux liée à des variations dans la plante peuvent rendre leur valorisation difficile [9,56].

### **b. Colorants utilisés aujourd'hui**

Les colorants sont définis dans le Règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques comme « les substances qui sont exclusivement ou principalement destinées à colorer le produit cosmétique, l'ensemble du corps ou certaines parties de celui-ci, par absorption ou réflexion de la lumière visible » [59]. Les colorants autorisés en cosmétique sont listés dans l'annexe IV de ce règlement [59]. Cette liste contient approximativement 8% de colorants végétaux, incluant plusieurs caroténoïdes, une anthraquinone, des naphthoquinones, les anthocyanes, la curcumine et l'extrait de betterave rouge, riche en bétalaïnes (Tableau I-1) [9,59].

Les extraits de plantes tinctoriales contiennent, en plus des colorants, de nombreux autres composés qui peuvent contribuer à l'activité ou la stabilité de l'extrait. Ainsi, dans la base de donnée COSMILE Europe [60], qui référence les ingrédients cosmétiques, on retrouve des extraits de plantes tinctoriales référencés sous d'autres fonctions, qui contiennent donc des colorants non listés dans l'annexe IV (Tableau I-1).

## CHAPITRE I

**Tableau I-1 : Colorants végétaux autorisés en cosmétique et exemples de plantes tinctoriales référencées dans la base de données COSMILE.**

| Classification | Colorants végétaux et plantes tinctoriales           | N° annexe IV <sup>1</sup> | Fonctions référencées dans la base de données COSMILE                                         |
|----------------|------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Curcuminoïdes  | Curcumine, CI 75300                                  | 114                       | Antioxydant, colorant                                                                         |
|                | <i>Curcuma longa</i> (racines)                       | -                         | Agent d'entretien de la peau, agent parfumant                                                 |
| Naphtoquinones | Shikalkine, CI 75530                                 | -                         | Agent d'entretien de la peau, colorant                                                        |
|                | Naphtazarine                                         | -                         | Colorant, conditionneur capillaire                                                            |
|                | Lawsone, CI 75480                                    | -                         | Colorant capillaire                                                                           |
|                | <i>Lawsonia inermis</i> (feuilles, fruits, fleurs)   | -                         | Agent apaisant, agent d'entretien de la peau, agent parfumant, colorant capillaire, tonifiant |
| Anthraquinones | Alizarine, CI 58000                                  | 86                        | Colorant                                                                                      |
|                | <i>Rubia tinctorum</i> (racines)                     | -                         | Agent apaisant, agent d'entretien de la peau, tonifiant                                       |
| Flavonoïdes    | Anthocyanes                                          | 149                       | Colorant                                                                                      |
|                | <i>Reseda luteola</i> (feuilles, tiges, fleurs)      | -                         | Agent d'entretien de la peau                                                                  |
|                | <i>Haematoxylum campechianum</i> (bois)              | -                         | Non précisée                                                                                  |
| Caroténoïdes   | $\beta$ -Carotène, CI 40800, CI 75130                | 55                        | Agent d'entretien de la peau, colorant                                                        |
|                | Apocaroténal, CI 40820                               | 56                        | Colorant                                                                                      |
|                | 8'-apo- $\beta$ -carotène-8'-oate d'éthyle, CI 40825 | 57                        | Colorant                                                                                      |
|                | Canthaxanthine, CI 40850                             | 58                        | Colorant                                                                                      |
|                | Crocétine, CI 75100                                  | 108                       | Colorant                                                                                      |
|                | Rocou, CI 75120                                      | 109                       | Colorant                                                                                      |
|                | Lycopène, CI 75125                                   | 110                       | Colorant, antioxydant                                                                         |
|                | $\beta$ ,T-Carotène-3-ol, CI 75135                   | 112                       | Colorant                                                                                      |
|                | Capsanthine/capsorubine                              | 147                       | Colorant                                                                                      |
|                | Crocin                                               | -                         | Colorant                                                                                      |
|                | <i>Bixa orellana</i> (graines)                       | -                         | Agent d'entretien de la peau, agent parfumant                                                 |
|                | <i>Crocus sativa</i> (stigmate)                      | -                         | Agent d'entretien de la peau, antioxydant                                                     |
| Bétalaïnes     | <i>Beta vulgaris</i> (racines)                       | 148                       | Colorant                                                                                      |
| Indigoïdes     | <i>Persicaria tinctoria</i> (feuilles)               | -                         | Agent d'entretien de la peau, colorant                                                        |
|                | <i>Indigofera tinctoria</i> (feuilles)               | -                         | Agent d'entretien de la peau, colorant capillaire                                             |
|                | <i>Isatis tinctoria</i> (feuilles)                   | -                         | Agent d'entretien de la peau, conditionneur capillaire                                        |

<sup>1</sup> : Numéro d'ordre du colorant dans l'annexe IV du Règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques [59]

### 2. Principales activités biologiques d'intérêt cosmétique

Les colorants d'origine végétale et plus généralement les extraits végétaux peuvent être valorisés en cosmétique pour diverses activités biologiques. Parmi ces activités, certaines peuvent être étudiées par colorimétrie ou fluorimétrie via des tests *in vitro* relativement accessibles. Certaines de ces activités sont étudiées non seulement pour une utilisation cosmétique dans tous types de produits (produits d'hygiène ou de soin de la peau ou des cheveux, maquillage etc.), mais aussi pour le secteur agro-alimentaire. Pour celles-ci, l'efficacité de nombreux extraits et molécules d'origine végétale, incluant certains colorants ont déjà été décrites. C'est le cas notamment de l'activité antioxydante, qui est une activité largement recherchée en cosmétique et en agroalimentaire. D'autres activités pouvant être testées *in vitro* sont plus spécifiques, comme l'inhibition d'enzymes liées au vieillissement ou l'absorption des rayons UV. Ces activités ne peuvent être valorisées que dans certains types de produits cosmétiques et la littérature à leur sujet est moins fournie, notamment en ce qui concerne les colorants végétaux.

Le principe et l'intérêt de ces activités est décrit dans la suite de cette partie. De plus, quelques exemples de colorants ou de familles de colorants actifs sont donnés. Le fonctionnement des tests d'activité n'est pas détaillé ici. Les tests ayant été réalisés au cours de la thèse seront développés dans les chapitres correspondants.

#### a. Activité antioxydante

Les radicaux libres sont des espèces réactives et instables dont la couche électronique externe porte un ou plusieurs électrons non appariés [61,62]. Les radicaux libres comportant un atome d'oxygène, nommés espèces réactives de l'oxygène (ERO), sont les principaux radicaux formés lors du métabolisme cellulaire. Ils comprennent notamment l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $\bullet HO$ ) et le radical oxyde nitrique ( $\bullet NO$ ), ainsi que des espèces non radicalaires pouvant mener à leur formation, comme l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), ou le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) [61,62]. Le stress oxydatif est le résultat d'un déséquilibre entre la génération de radicaux libres et les mécanismes de défense antioxydante de l'organisme [61,63]. Les radicaux libres vont alors causer la dégradation de biomolécules comme les protéines, les lipides ou l'ADN. De plus, la réactivité des radicaux libres entre eux, avec les biomolécules ou avec les métaux de transitions induit la formation d'autres radicaux, causant une réaction en chaîne [63]. Au niveau de la peau, cela se traduit principalement par un vieillissement prématuré [64].

## CHAPITRE I

Les antioxydants sont des molécules capables d'empêcher la réaction de propagation des espèces réactives, ou de prévenir leur formation [63]. Les antioxydants piègeurs de radicaux libres, ou antioxydants primaires, peuvent convertir les ERO en espèces non radicalaires plus stables via un transfert d'atome d'hydrogène ou d'électron. Les antioxydants secondaires peuvent être des chélateurs de métaux de transition ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  et  $Cu^{2+}$ ) ou co-facteurs de certains systèmes enzymatiques, ou au contraire inhiber certaines enzymes [63–65].

En cosmétique, les antioxydants peuvent avoir un rôle de conservateurs, et limiter l'oxydation des autres ingrédients, ou bien être utilisés comme bioactifs qui permettent de lutter contre le vieillissement cutané [64]. Les extraits de plantes contiennent généralement des antioxydants appartenant à des familles moléculaires différentes et agissant par des mécanismes complémentaires. Cette complémentarité d'activités est un axe de valorisation déjà exploité par l'industrie cosmétique, mais elle rend aussi l'activité antioxydante totale complexe à étudier *in vitro* [63–65]. En effet, aucun test *in vitro* ne permet de mesurer de manière réaliste l'activité antioxydante d'un extrait et il est nécessaire de réaliser différents tests complémentaires [63,65].

Les caroténoïdes et flavonoïdes sont particulièrement réputés pour leur activité antioxydante, mais d'autres colorants végétaux utilisés en cosmétique, comme la curcumine, les bétalaïnes ou l'alizarine, sont aussi des antioxydants [31,62,65–67].

### **b. Activité anti-âge**

Le vieillissement de la peau est un phénomène naturel lié à l'âge qui apparaît suite à des changements hormonaux et une diminution du renouvellement cellulaire [68]. Il peut être accéléré par différents facteurs incluant l'exposition aux rayonnements solaires, la pollution de l'air, le tabagisme et la température, mais aussi le manque de sommeil, le stress et l'alimentation [69]. Ses principaux effets visibles sont l'apparition de taches pigmentaires et de rides, une perte d'élasticité, une irrégularité du teint, un relâchement et une plus grande fragilité de la peau [68,70,71]. Ces changements sont dus à une désorganisation et une diminution de la quantité de fibroblastes, de collagène et d'élastine, perturbant le maintien et l'élasticité de la peau, ainsi qu'une augmentation de l'activité de l'interleukine  $1\alpha$  (IL- $1\alpha$ ) dans les kératinocytes, causant une augmentation du nombre de mélanocytes et de l'activité de la tyrosinase, à l'origine des taches pigmentaires [71]. La formation d'ERO lors du métabolisme cellulaire intrinsèque ou à la suite de l'exposition aux facteurs extrinsèques est l'une des principales causes de ces dommages [70].

## CHAPITRE I

Les antioxydants, anti-inflammatoires et filtres anti-UV permettent de lutter contre le vieillissement de la peau, mais d'autres activités plus spécifiques peuvent être ciblées afin d'évaluer la capacité anti-âge d'un extrait ou d'une molécule [70]. Les principales cibles des tests d'activité anti-âge *in vitro* sont les enzymes qui inhibent la dégradation des protéines constitutives de la matrice cutanée (élastase, collagénase et hyaluronidase) et la tyrosinase, responsable des taches pigmentaires [68]. Plusieurs flavonoïdes présentent une activité anti-âge liée à l'inhibition d'une ou plusieurs de ces enzymes [72].

### c. Filtres anti-UV

Une exposition prolongée au soleil peut causer des coups de soleil, mais elle est aussi la première cause de nombreux cancers et du vieillissement prématuré de la peau [58]. La lumière du soleil est formée de radiations électromagnétiques appartenant aux domaines des ultraviolets (100-400 nm), du visible (400-800 nm) et de l'infrarouge (800 nm-1 440 nm) [58,73,74]. Les rayonnements ultraviolets (UV) correspondent à seulement 5% des rayonnements, mais sont responsables de la majorité des cancers et autres dommages causés à la peau [69]. Ils sont divisés en trois catégories en fonction de leur longueur d'onde : UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) et UV-C (100-290 nm) [58,73,74]. Les UV-A pénètrent la peau et peuvent toucher le derme et les tissus sous-cutanés où ils causent des dommages indirects liés à la formation d'ERO. Ces dernières sont responsables de dommages oxydatifs qui accélèrent le vieillissement de la peau [73,74]. Les UV-B touchent l'épiderme, sans pénétrer plus profondément dans la peau. En raison de leur énergie plus élevée, ils causent des dommages directs à la peau, et sont notamment les principaux responsables des coups de soleil [73,74]. Les UV-C sont de potentiels mutagènes et carcinogènes, mais ils sont bloqués par l'atmosphère et n'atteignent pas la peau [65,73,74].

En cosmétique, il existe différentes stratégies pour lutter contre les effets du soleil sur la peau. Les filtres UV permettent d'éviter que les rayonnements UV n'atteignent la peau, tandis que les antioxydants peuvent limiter leurs effets sur la peau [58]. Il existe deux types de filtres UV, qui diffèrent par leur origine et par leur mécanisme d'action. Les filtres inorganiques, ou physiques, comme le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) et l'oxyde de zinc (ZnO), reflètent et diffusent les rayonnements UV, empêchant leur pénétration dans la peau [73,75]. Les filtres organiques, ou chimiques, sont eux capables d'absorber les rayonnements UV et de les convertir en radiations de faible énergie inoffensives avant de les transmettre à la peau [73,75]. Parmi les principaux filtres chimiques on retrouve par exemple l'oxybenzone, l'octocrylène,

## CHAPITRE I

l'avobenzone et l'octinoxate [75]. Ces composés sont utilisés dans des filtres solaires, mais aussi dans de nombreux autres produits cosmétiques et comme photostabilisants dans certains plastiques [75].

Les filtres organiques sont suspectés d'avoir des effets délétères sur la santé humaine et sur l'environnement [76,77]. Ils peuvent pénétrer l'organisme par absorption percutanée et ont été retrouvés dans le sang et l'urine, mais aussi dans le placenta et le lait maternel humains dans diverses études [77]. Les études réalisées *in vitro*, mais aussi *in vivo* sur différentes espèces, incluant l'homme, ont montré que les filtres UV organiques sont de potentiels perturbateurs endocriniens [76,77]. Cependant, bien qu'ils soient largement utilisés depuis les années 1970, aucun effet toxique systémique lié à leur utilisation n'a été rapporté à ce jour [76]. Toutefois, plusieurs filtres UV organiques peuvent causer des irritations, voire des dermatites de contact et sont suspectés d'être photosensibilisants et phototoxiques [58,77].

Les filtres UV chimiques sont inévitablement rejetés dans l'environnement, que ce soit par l'immersion dans des plans d'eau naturels, par rinçage lors de la douche ou par excrétion dans les urines. On les retrouve aussi dans les déchets des entreprises qui les commercialisent ou les utilisent dans leurs formulations [75]. La présence de filtres chimiques dans les eaux usées est un enjeu pour l'environnement, car ces molécules sont mal éliminées lors du traitement des eaux usées, notamment en raison de leur faible solubilité dans l'eau [75]. Des études menées sur tous les continents ont retrouvé ces molécules dans les stations d'épuration des eaux, ainsi que dans leurs effluents [75].

Leurs effets sur l'environnement sont multiples. Le plus connu est le blanchissement des coraux, mais les filtres chimiques ont aussi un impact sur le développement et la reproduction de la faune aquatique [75,77]. De plus, l'accumulation de ces molécules dans les espaces aquatiques mène à leur accumulation dans les organismes aquatiques et à leur biomagnification, c'est-à-dire une augmentation de leur concentration dans les espèces les plus hautes de la chaîne alimentaire [75]. Des études menées en Suisse, en Norvège et en Espagne ont notamment retrouvé des concentrations faibles, mais détectables d'oxybenzone et d'octocrylène dans plusieurs espèces consommées par l'homme, dont la perche, le foie de morue et les moules [75,77]. A long terme, la présence de ces polluants dans l'alimentation humaine pourrait impacter la santé des consommateurs, bien qu'aucun effet n'ait encore été rapporté [75,77].

Les plantes produisent de nombreux métabolites secondaires capables d'absorber les rayonnements UV qui pourraient constituer une alternative biodégradable et non toxique, qui serait donc plus durable [58,65]. Parmi les colorants végétaux, ce sont les caroténoïdes et les flavonoïdes qui sont le plus utilisés à ces fins de par leur capacité d'absorption des rayonnements UV et leur activité antioxydante [58].

### III. L'eau comme solvant vert pour l'extraction des colorants végétaux

#### A. Aspects environnementaux

##### 1. L'éco-extraction à l'eau

###### a. Définition de l'éco-extraction

Les extraits végétaux sont d'ores et déjà valorisés dans les secteurs cosmétique, agro-alimentaire et pharmaceutique [10,11]. Cependant, le procédé d'extraction employé impacte non seulement le rendement et le coût de production, mais aussi la qualité et l'innocuité de l'extrait final [10]. L'éco-extraction, ou extraction verte, est un concept publié pour la première fois en 2012 par Chemat *et al.* [11]. Son objectif est de réduire l'impact environnemental des procédés d'extraction et elle est définie comme basée sur « *la découverte et le développement de procédés d'extraction qui vont réduire la consommation d'énergie, permettre l'utilisation de solvants alternatifs et de produits naturels renouvelables et assurer un extrait/produit sûr et de haute qualité* » [11].

L'extraction verte s'inscrit dans la suite de la chimie verte, un concept développé au début des années 1990 par Anastas *et al.* [78]. Elle s'organise autour de 6 principes, inspirés des 12 principes de la chimie verte, mais adaptés au domaine de l'extraction [10,11]. Ces principes sont centrés sur la plante source, l'utilisation de solvants alternatifs, la réduction de la consommation d'énergie, la production de co-produits et non de déchets, la réduction des opérations unitaires et l'obtention d'un extrait à faible impact environnemental, biodégradable, non dénaturé, sans contaminants et de haute qualité (Figure I-19) [10,11].

## CHAPITRE I

### 1. Plante

Favoriser l'innovation par la sélection variétale et l'utilisation de ressources végétales renouvelables

### 2. Solvant

Privilégier les solvants alternatifs et principalement ceux issus des agro-ressources

### 3. Energie

Réduire la consommation énergétique par l'assistance des technologies innovantes et favoriser la récupération d'énergie

### 4. Co-produits

Favoriser la création de co-produits au lieu de déchets pour intégrer la voie de la bio- ou agro-raffinerie

### 5. Etapes

Réduire les opérations unitaires grâce à l'innovation technologique et favoriser les procédés sûrs, robustes et contrôlés

### 6. Eco-extrait

Privilégier un produit non dénaturé, biodégradable, sans contaminants et surtout porteur de valeurs : «éco-extrait»

**Figure I-19** : Les six principes de l'éco-extraction.

Le développement de procédés d'éco-extraction peut répondre aux enjeux climatiques du XXI<sup>e</sup> siècle en diminuant l'impact environnemental des extraits végétaux et des produits dans lesquels ils sont inclus [10,11]. En effet, l'objectif d'un procédé d'éco-extraction est de protéger à la fois l'environnement et le consommateur par l'obtention d'un éco-extrait. Pour les entreprises, c'est une opportunité de développement économique et écologique en développant des procédés innovants et compétitifs ayant une efficacité au moins égale aux méthodes conventionnelles, tout en diminuant le nombre d'étapes et la consommation d'énergie et de solvant [11].

#### **b. L'eau : un solvant vert**

Le deuxième principe de l'éco-extraction et le cinquième principe de la chimie verte sont centrés sur l'économie de solvants et l'utilisation de solvants alternatifs aux solvants organiques issus de la pétrochimie [11,79]. En effet, ces solvants sont généralement toxiques, inflammables et liés à la pollution de l'eau et des sols, ainsi qu'au réchauffement climatique [11,79–81]. Il est donc nécessaire de se tourner vers des solvants alternatifs, plus sûrs et à faible impact environnemental [1,10,11,79].

L'une de ces alternatives est l'eau, un solvant accessible, naturellement abondant et renouvelable qui apparaît dans la formulation de la plupart des produits contenant des

## CHAPITRE I

extraits végétaux. L'eau est considérée comme l'un des solvants les plus verts car elle est accessible, non toxique, non polluante et peut être manipulée relativement aisément et sans danger [12,79,81]. Elle est notamment recommandée dans les guides de sélection de solvants basés sur des critères environnementaux, de sécurité et de santé édités par les entreprises pharmaceutiques Pfizer, Sanofi et GlaxoSmithKline (GSK), ainsi que celui de CHEM21, un consortium européen incluant des entreprises pharmaceutiques et plusieurs universités [82–85]. Le tableau I-2 présente une comparaison de l'eau à différents solvants conventionnels d'extraction de polarités différentes (méthanol, acétone, acétate d'éthyle et heptane), ainsi qu'à trois solvants verts utilisés en cosmétique (éthanol, glycérol et propylène glycol). Cette comparaison est basée sur les scores donnés dans les guides de sélection de solvant de GSK, Chem21 et Sanofi, sur des critères environnementaux, de santé et de sécurité [82,83,85].

L'extraction à l'eau répond à plusieurs critères de l'extraction verte [11,12]. Le plus évident est le principe 2, lié au choix de solvant, mais les principes 4 et 6 sont aussi directement impactés par l'extraction à l'eau. En effet, après une extraction à l'eau, les résidus de végétal et l'extrait obtenu sont biodégradables, non toxiques et dépourvus de contaminants, au même titre que la matière végétale introduite à l'entrée du procédé. Conformément au principe 4, les résidus deviennent alors des co-produits d'extraction qui peuvent être valorisés sans contrainte dans tous les secteurs. Quant à l'extrait, il correspond à la définition d'éco-extrait puisqu'il est biodégradable, non dénaturé et ne contient pas de contaminants. L'utilisation de ressources végétales renouvelables et de méthodes d'éco-extraction innovantes est compatible avec l'utilisation de l'eau comme solvant et permet de répondre aux derniers principes d'éco-extraction [11]. Lajoie *et al.* ont aussi montré que l'extraction à l'eau remplit 11 des 17 objectifs de développement durable [12,86].

## CHAPITRE I

**Tableau I-2 :** Comparaison de l'eau à des solvants classiques d'extraction (méthanol, acétone, acétate d'éthyle, heptane) et à trois solvants verts (éthanol, glycérol, 1,3-propanediol) basée sur les guides de sélection de solvants de GSK, CHEM21 et Sanofi

|                                                                                                                                                  | Eau | Méthanol                | Acétone        | Acétate d'éthyle | Heptane                          | Ethanol        | Glycérol | 1,3-propanediol |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------|----------------|------------------|----------------------------------|----------------|----------|-----------------|
| Température d'ébullition (°C)                                                                                                                    | 100 | 65                      | 56             | 77               | 98                               | 78             | 290      | 214             |
| Pictogrammes de danger                                                                                                                           | -   | SGH02<br>SGH06<br>SGH08 | SGH02<br>SGH07 | SGH02<br>SGH07   | SGH02<br>SGH07<br>SGH08<br>SGH09 | SGH02<br>SGH07 | -        | -               |
| Scores du guide de sélection de GSK (échelle de 1 à 10 allant du plus problématique au plus vert) d'après Henderson <i>et al.</i> [85]           |     |                         |                |                  |                                  |                |          |                 |
| Déchets                                                                                                                                          | 4   | 4                       | 3              | 4                | 6                                | 3              | 6        | 6               |
| Impact environnemental                                                                                                                           | 10  | 9                       | 9              | 8                | 3                                | 8              | 7        | 6               |
| Santé                                                                                                                                            | 10  | 5                       | 8              | 8                | 8                                | 8              | 8        | 9               |
| Inflammabilité et explosivité                                                                                                                    | 10  | 5                       | 4              | 4                | 3                                | 6              | 10       | 10              |
| Réactivité                                                                                                                                       | 10  | 10                      | 9              | 8                | 10                               | 9              | 9        | 10              |
| Score d'évaluation du cycle de vie                                                                                                               | 10  | 9                       | 7              | 6                | 7                                | 9              | 8        | 3               |
| Scores du guide de sélection de solvants de CHEM21 (échelle de 1 à 10 allant du plus vert au plus problématique) d'après Prat <i>et al.</i> [87] |     |                         |                |                  |                                  |                |          |                 |
| Score de sécurité                                                                                                                                | 1   | 4                       | 5              | 5                | 6                                | 4              | 1        | 1               |
| Score de santé                                                                                                                                   | 1   | 7                       | 3              | 3                | 2                                | 3              | 1        | 1               |
| Score environnemental                                                                                                                            | 1   | 5                       | 5              | 3                | 7                                | 3              | 7*       | 7*              |
| Scores du guide de sélection de solvant de Sanofi (échelle de 1 à 5 allant du plus vert au plus problématique) d'après Prat <i>et al.</i> [84]   |     |                         |                |                  |                                  |                |          |                 |
| Sécurité                                                                                                                                         | 1   | 3                       |                | 2                | 2                                | 1              |          | 2               |
| Santé                                                                                                                                            | 1   | 3                       |                | 4                | 5                                | 3              |          | 2               |
| Environnement                                                                                                                                    | 1   | 1                       |                | 1                | 5                                | 1              |          | 1               |

\* Scores environnementaux affectés par la température d'ébullition élevée

### 2. Les défis environnementaux liés à l'extraction à l'eau

La principale limite de l'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction au niveau environnemental est la difficulté de la recycler par distillation. En effet, l'eau a la plus haute énergie de vaporisation connue ( $586.0 \text{ cal.g}^{-1}$ , soit environ  $2450 \text{ kJ.g}^{-1}$ ), qui correspond à l'énergie nécessaire pour évaporer 1 g d'eau, ainsi qu'une température d'ébullition relativement élevée ( $100^\circ\text{C}$ ) [82,87]. Ces propriétés sont liées à une consommation d'énergie plus élevée pour évaporer l'eau que pour les autres solvants. De plus, la température d'ébullition de l'eau est proche de celle d'autres solvants comme le butanol ou l'acide formique et elle est capable de former des mélanges azéotropes avec plusieurs solvants, dont l'éthanol, souvent utilisé en mélange avec l'eau pour l'extraction végétale [85,88]. Ces deux caractéristiques peuvent encore compliquer le recyclage de l'eau par distillation [88]. Il y a donc un intérêt à ne pas évaporer les extraits aqueux et à préférer d'autres alternatives plus durables comme l'incorporation directe de l'extrait dans le produit fini.

Une des raisons pour lesquelles l'eau est considérée comme l'un des solvants les plus verts est son abondance naturelle, mais ce n'est pas une ressource illimitée [89]. En effet il n'y a que 3% d'eau douce sur la planète et une fraction encore plus faible d'eau potable [1]. De plus, dans le contexte actuel de réchauffement climatique et de stress hydrique, il est nécessaire de limiter la consommation d'eau lorsque c'est possible [1,89]. L'intensification du procédé d'extraction par l'utilisation de techniques innovantes permet de diminuer la quantité de solvant nécessaire par rapport aux méthodes conventionnelles [10]. Pour diminuer l'empreinte eau d'un produit cosmétique, c'est-à-dire son impact environnemental relatif à l'eau, il faut diminuer sa consommation à tous les niveaux du cycle de vie du produit [89]. Il est possible d'économiser l'eau directe, c'est-à-dire l'eau de formulation du produit, mais aussi l'eau indirecte, utilisée lors de la culture des plantes, de l'extraction, mais aussi de la production des emballages par exemple [89]. Enfin, il est nécessaire d'éviter la contamination de l'eau en limitant l'utilisation de produits polluants de la culture à la formulation [89]. Ce dernier point est particulièrement affecté par le développement de procédés d'éco-extraction à l'eau. En effet, il permet d'éviter l'usage de solvants polluants et de remplacer un ou plusieurs ingrédients synthétiques par l'extrait végétal, qui est biodégradable [8,89].

Afin de limiter encore l'impact environnemental de la valorisation cosmétique des éco-extraits aqueux, il faudrait ainsi éviter l'évaporation de l'extrait et limiter l'usage direct de l'eau dans

les formulations. L'eau constitue 60% à 85% de crèmes cosmétiques et dans d'autres types de formulations comme les lotions ou les gels, elle représente jusqu'à 95% de la formulation [89,90]. Au lieu de sécher l'extrait aqueux avant de solubiliser à nouveau dans une formule à base d'eau, il est possible d'utiliser directement l'extrait liquide comme eau de formulation. Cela permettrait de réduire le nombre d'étapes du procédé global de production, ainsi que sa consommation d'eau et d'énergie. Cette méthode est déjà implémentée pour les eaux florales, issues de l'hydro-distillation des huiles essentielles, mais pourrait être étendue à toutes sortes d'extraits végétaux aqueux [89]. Cependant, cela implique l'adaptation du procédé global, de l'extraction jusqu'à la formulation, afin de limiter la consommation d'eau, mais aussi d'éviter le développement de micro-organismes dans l'extrait avant sa formulation.

## B. Capacité d'extraction de l'eau

### 1. Polarité de l'eau

L'un des premiers paramètres envisagés lors du choix d'un solvant d'extraction est sa polarité. Les solvants ne peuvent à priori solubiliser et donc extraire, que les molécules dont la polarité est proche de la leur [81]. L'eau étant un solvant polaire, elle permet d'extraire préférentiellement les composés les plus polaires [81,91]. Un des paramètres permettant de déterminer la polarité d'un solvant est sa constante diélectrique. L'eau a une constante diélectrique de 78,3 à 25°C, ce qui est plus élevé que tous les autres solvants d'extraction (Figure I-20).

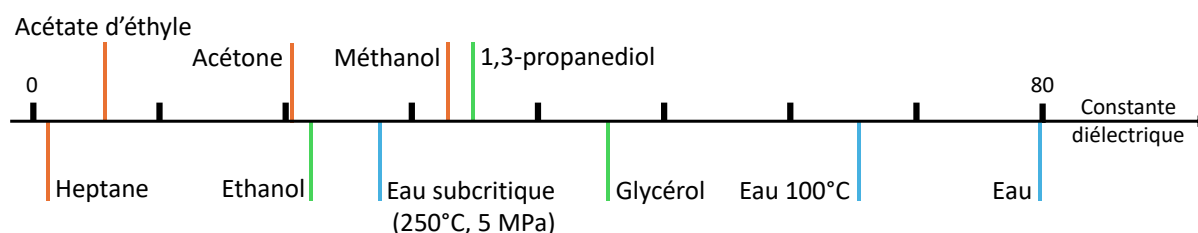


**Figure I-20 :** Constante diélectrique d'une sélection de solvants d'extraction (orange), de solvants verts autorisés en cosmétique (vert) et de l'eau dans différentes conditions (bleu). Les constantes diélectriques utilisées sont celles des solvants à 20°C, excepté pour l'eau à 100°C et l'eau subcritique. Données issues de [92–94].

Elle doit cela à l'orientation des dipôles des molécules d'eau reliées par des liaisons hydrogène [91,95]. En effet, les molécules d'eau sont des dipôles, des molécules possédant un pôle chargé négativement et un pôle chargé positivement. De cette structure découle leur capacité à se lier entre elles par des liaisons hydrogène entre deux pôles de charge opposée [87].

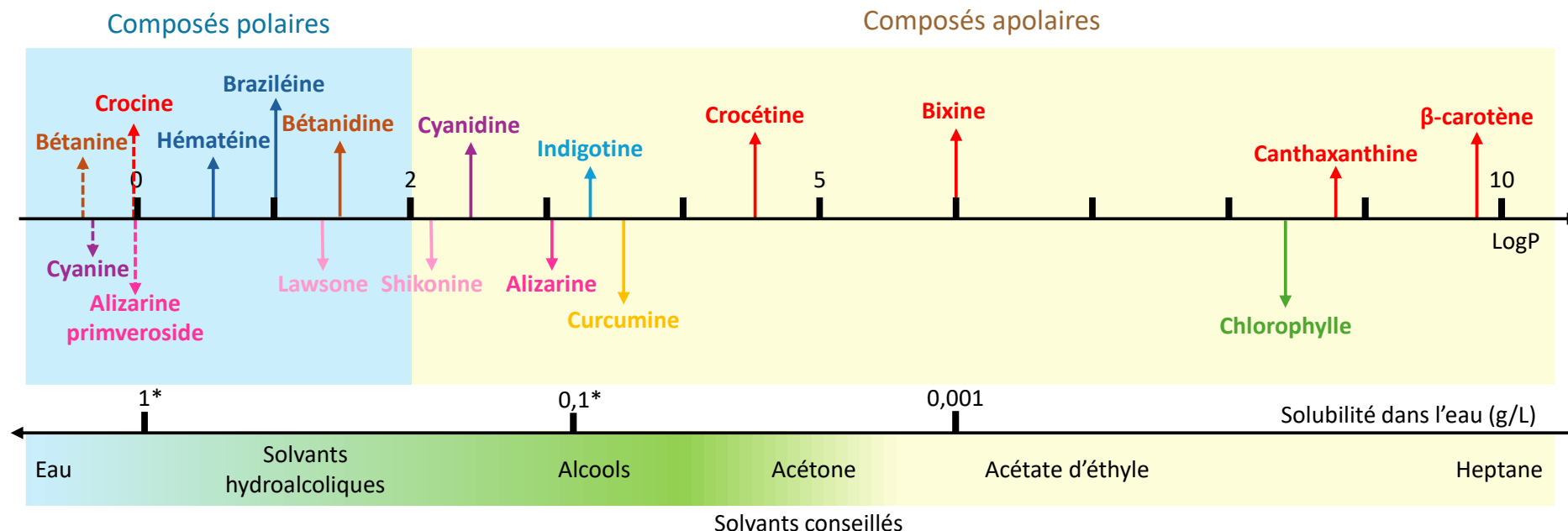
## CHAPITRE I

Cependant, l'augmentation de température et de pression perturbent les liaisons hydrogène et permettent alors de diminuer la polarité de l'eau en abaissant sa constante diélectrique, qui s'approche alors de celles de solvants organiques comme le méthanol (Figure I-20) [12,91,95].

### 2. Solubilité des colorants végétaux dans l'eau

La solubilité dans l'eau d'une molécule peut être approchée par son coefficient de partage entre l'octanol et l'eau :  $\text{LogP} = \log([\text{octanol}]/[\text{eau}])$ . Ainsi, les molécules les plus hydrophiles possèdent un LogP inférieur à zéro, correspondant à un partage préférentiel dans l'eau [92]. Inversement, un  $\text{LogP} > 2$  correspond à une concentration dans l'octanol 100 fois plus élevée que dans l'eau et donc à une molécule apolaire. Une gamme de polarité des colorants végétaux a été construite en utilisant leur LogP, calculé avec le programme ALOGPS 2.1 créé par Tantko et Tanchuk (Figure I-21) [96,97]. Parmi les composés polaires ( $\text{LogP} < 2$ ), on retrouve les bétalaïnes, la braziléine et l'hématéine, la crocine, ainsi que la plupart des composés phénoliques glycosylés. D'autres colorants végétaux possèdent un LogP plus élevé et sont donc moins polaires, comme l'indigo, la curcumine ou les anthraquinones non glycosylées. Enfin, les colorants connus pour être liposolubles comme les carotènes, les xanthophylles ou la chlorophylle ont un LogP encore plus élevé ( $\text{LogP} > 8$ ) (Figure I-21). La solubilité dans l'eau des colorants représentés a été calculée avec le même logiciel (Figure I-21). Une grande partie des colorants végétaux est peu polaire, ce qui influe directement sur leur solubilité dans l'eau. Ainsi, la solubilité des colorants au  $\text{LogP} > 0$  est inférieure à 1 g/L et au-delà d'un  $\text{LogP} = 6$ , elle est inférieure à 1 mg/L (Figure I-21). La gamme de solvants décrits précédemment a aussi été ajoutée sur la Figure I-21 afin de représenter les solvants adaptés pour chaque polarité de molécule. L'eau seule est capable de solubiliser efficacement une minorité de composés. Néanmoins, différentes méthodes peuvent être utilisées afin d'étendre la gamme de composés accessibles. Les méthodes d'extraction à l'eau appliquées aux colorants végétaux décrites dans la littérature sont détaillées dans la partie suivante.

## CHAPITRE I



\* Exceptions : vulgaxanthine (0,26 g/L), crocine (0,57 g/L), cyanidine (0,05 g/L)

**Figure I-21 :** Représentation de la polarité et de la solubilité des colorants végétaux.

En haut : gamme de LogP des colorants naturels. Chaque couleur correspond à une famille moléculaire : marron : bétalaïnes, violet : anthocyanes, rose foncé : anthraquinones, rose clair : naphtoquinones, bleu foncé : homoisflavonoïdes, bleu clair : indigo, rouge : caroténoïdes, jaune : curcumine et vert : chlorophylle. Les flèches pleines correspondent à des génines et les flèches en tirets correspondent à des composés glycosylés. En bas : échelle de solubilité dans l'eau des colorants représentés. Le solvant de solubilisation le plus adapté parmi la gamme décrite précédemment est affiché pour chaque zone de l'échelle. Les LogP et la solubilité dans l'eau ont été calculés avec le logiciel ALOGPS 2.1 [96,97].

### C. Revue des méthodes d'extraction à l'eau utilisées pour les colorants végétaux

#### 1. Méthodes d'extraction conventionnelles

##### a. Extractions à l'eau

Les colorants hydrosolubles peuvent être extraits dans l'eau à différentes températures, par macération, décoction ou broyage avec solvant, qui ont été rassemblés ici sous le terme « d'extraction sous agitation », ainsi que par reflux ou soxhlet. Ces méthodes conventionnelles utilisent une action mécanique et/ou la température pour améliorer le rendement d'extraction [98]. Elles sont généralement longues (jusqu'à plusieurs jours) et consomment plus ou moins d'énergie en fonction de leur durée et de la température utilisée [99].

Les bétalaïnes étant des colorants hydrosolubles, la macération et le broyage dans l'eau sont régulièrement utilisés pour les extraire à partir de diverses sources végétales [100–110]. Prakash *et al.* ont optimisé l'extraction par chauffage sous agitation à l'eau des bétalaïnes à partir du fruit du figuier de barbarie (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.). Une approche par plan d'expériences utilisant les concentrations de bétacyanines et bétaxanthines dans les extraits comme réponses leur ont permis de déterminer que les conditions optimales étaient 115 min d'extraction sous agitation à 40°C avec un ratio de 1,44 g de plante pour 50 mL [103]. Une étude similaire menée par Swamy *et al.* à partir de la betterave rouge (*Beta vulgaris* L.) a obtenu comme conditions optimales 84 min d'extraction sous agitation à 60°C avec un ratio de 1,5 g de plante pour 50 mL [104]. D'après ces travaux, l'extraction des bétalaïnes à l'eau ne nécessite pas une température élevée (40 à 60°C), ni un temps d'extraction très long (moins de 2 h).

Lavanya *et al.* et Castellar *et al.* ont obtenu des extraits plus riches en bétalaïnes avec l'eau, comparée à différents mélanges hydroalcooliques à base d'éthanol ou de méthanol. Leur étude a été réalisée sur les pétales de bougainvillier (*Bougainvillea spectabilis* Willd.) et de célosie argentée (*Celosia argentea* L.) par une macération d'une nuit à 25°C avec un ratio d'un gramme pour 100 mL de solvant. Les solvants comparés étaient l'eau, l'acétone, l'éthanol, le méthanol et deux mélanges hydroalcooliques contenant 50% d'éthanol ou de méthanol. Le rendement en bétacyanines obtenu à l'eau était deux fois supérieur à celui obtenu avec les solvants hydroalcooliques pour la célosie, mais la différence était moins marquée pour le bougainvillier. Dans les deux cas, l'extraction à l'eau était bien plus efficace sur les pétales

## CHAPITRE I

séchés que sur les pétales frais [106]. Castellar *et al.* ont optimisé l'extraction de la bétanine à partir des fruits d'*Opuntia stricta* (Haw.) Haw., une espèce proche du figuier de barbarie. L'extrait aqueux était légèrement plus riche en bétanine que les extraits obtenus avec des mélanges hydroalcooliques contenant 40%, 60% et 80% d'éthanol [107].

Pourtant, les mélanges hydroalcooliques sont souvent décrits comme plus efficaces que l'eau seule pour extraire les bétalaïnes par chauffage sous agitation [100,105,111,112]. Nhon et Hang ont réalisé une d'extraction sous agitation de 120 min à 30°C avec un ratio plante/solvant de 1/20 en utilisant différents solvants. Ils ont ainsi comparé l'efficacité de l'eau à celle de l'éthanol et de mélanges hydroalcooliques contenant 20 à 80% d'éthanol ou 40% de méthanol. L'extraction la plus efficace a été réalisée avec 20% d'éthanol, le rendement en bétalaïnes étant plus de 2 fois plus élevé que celui obtenu avec l'eau [105].

Les anthocyanes sont des composés polaires pouvant être extraits à l'eau par chauffage sous agitation [113]. Dans la littérature, on retrouve plusieurs exemples d'extraction à l'eau [114–120]. Tsai *et al.* et Cissé *et al.* ont optimisé l'extraction à l'eau des anthocyanes à partir des pétales de roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) [116,118]. Les premiers ont réalisé une cinétique de l'activité antioxydante, après avoir vérifié que celle-ci était corrélée à la couleur, donc à la concentration en anthocyanes de l'extrait. D'après leurs travaux, l'extraction des anthocyanes dans l'eau bouillante avec un ratio de 3 g/100 mL était maximale après seulement 3 minutes d'extraction [118]. Cissé *et al.* ont optimisé le ratio plante/eau (1/5-1/25) et la température (25-90°C) et ont déterminé que les meilleures conditions étaient le ratio le plus élevé et la température la plus basse, en raison de la thermolabilité des anthocyanes. Grâce à un modèle cinétique, ils ont pu montrer l'importance de la granulométrie du broyat de la plante extraite. En effet, l'extraction était optimale après 10 min lorsque les pétales étaient broyés finement (150 µm), alors que le plateau de rendement d'extraction n'était pas atteint après 10 h d'extraction dans les conditions optimales sur pétales entiers [116].

Cependant, comme pour les bétalaïnes, les mélanges hydroalcooliques voire l'éthanol ou le méthanol purs sont généralement plus efficaces que l'eau [113,119,121–124]. Backes *et al.* ont réalisé un plan d'expériences afin d'optimiser l'extraction des anthocyanes de la peau de figue (*Ficus carica* L.) . Ils ont étudié l'influence de la température (40-115°C), du temps d'extraction (5-55 min) et de la proportion d'éthanol dans le solvant hydroalcoolique d'extraction (0-100%) sur le rendement d'extraction et la concentration en cyanidine

## CHAPITRE I

exprimée par gramme d'extrait et par gramme de plante. Les conditions optimales d'extraction décrites par les auteurs sont 13,7 min, 35,6°C et 100% d'éthanol [124]. Chandrasekhar *et al.* ont comparé l'efficacité de l'extraction des anthocyanes du chou rouge par l'eau pure ou additionnée de 20 à 80% d'éthanol. Dans cette étude, c'est le mélange éthanol/eau (50/50) qui a donné les meilleurs résultats [123].

La braziléine est un colorant hydrosoluble traditionnellement extrait par la décoction du duramen de *Biancaea sappan* (L.) Tod. (ou *Caesalpinia sappan* L.) [125]. Setthaksa *et al.* ont optimisé son extraction sous agitation entre 45 et 90°C pendant 30 à 60 min avec un ratio de 50 g/300 mL. Le rendement le plus élevé et la concentration de braziléine étaient optimaux après 30 min d'extraction à 95°C [126]. La plupart des méthodes d'extraction décrites utilisent des alcools ou mélanges hydroalcooliques plutôt que de l'eau pour extraire les colorants de *B. sappan* [125].

Les stigmates du safran (*Crocus sativa*) contiennent des crocines, qui sont des caroténoïdes glycosylés hydrosolubles [127]. Celles-ci peuvent être extraites à l'eau en utilisant des méthodes d'extraction conventionnelles [127–133]. Halataei *et al.* ont comparé l'efficacité de l'eau et de l'éthanol dans une percolation du safran et déterminé que l'extrait eau contenait environ 1,5 fois plus de crocines [129]. Plusieurs travaux ont cependant montré que les mélanges hydroalcooliques sont plus efficaces que l'eau pour extraire les crocines du safran ou du gardénia (*Gardenia jasminoides* J.Ellis.) [128,134,135].

De Abreu *et al.* ont extrait les co-produits du fruit de l'anacardier (*Anacardium occidentale* L.) par pressage à l'eau et ont ainsi obtenu un extrait riche en carotènes et xanthophylles. Ces composés étant insolubles dans l'eau, il s'agit d'une suspension de caroténoïdes. [136].

Il y a peu de travaux sur l'extraction des naphtoquinones et anthraquinones à l'eau utilisant des méthodes conventionnelles. En effet, ces composés sont presque insolubles dans l'eau et les solvants organiques sont plus efficaces pour les extraire [31,137]. Pour les naphtoquinones, on retrouve tout de même quelques extractions sous agitation de la lawsone à partir des feuilles de henné (*Lawsonia inermis* L.) et de la juglone à partir de l'écale de noix (*Juglans regia* L.) [138–140]. Kavepour *et al.* ont notamment réalisé un plan d'expériences afin d'optimiser l'extraction de la lawsone dans l'eau. Ils ont étudié le temps d'extraction (2-24 h), le ratio plante/eau (5 g pour 10-100 mL) et la température (40-90°C). Ils ont déterminé que l'extraction était optimale avec un ratio de 5 g/100 mL, à 40°C pendant 2 h [138]. Cependant,

## CHAPITRE I

Knathamat *et al.* ont réalisé une extraction de henné à 80°C pendant 30 min et n'ont pas pu détecter de lawsone [137]. De plus, plusieurs travaux réalisés sur l'extraction de la juglone ont conclu que l'eau ne permettait pas d'extraire ce composé [141,142]. Concernant les anthraquinones, bien que certains travaux décrivent des extractions sous agitation ou reflux à l'eau efficaces [143–147], ils ne montrent pas de comparaison à d'autres solvant, tandis que d'autres auteurs ont conclu que les méthodes d'extraction conventionnelles à l'eau ne permettaient d'extraire que les anthraquinones glycosylées, et non les génines [148,149].

Kowalska *et al.* ont décrit l'extraction de la chlorophylle et d'autres composés d'intérêt non colorés de l'ortie (*Urtica dioica* L.) et de la menthe poivrée (*Mentha x piperita* L.) sous simple agitation à différentes températures (20-80°C, 250 g/100 mL, 10 min). Cependant, leurs résultats montrent une concentration en chlorophylle 2 à 4 fois plus faible dans l'extrait aqueux par rapport à l'extrait éthanolique [150].

### **b. Modulation du pH**

La modification du pH permet d'améliorer la solubilité ou la stabilité de certains colorants végétaux afin de faciliter leur extraction par les méthodes d'extraction conventionnelles. Les bétalaïnes sont plus hydrosolubles et plus stables à pH acide [151]. Plusieurs travaux décrivent leur extraction sous agitation dans l'eau acidifiée par de l'acide chlorhydrique (HCl) ou de l'acide citrique [151–155]. De Azeredo *et al.* ont optimisé l'extraction des bétalaïnes de betterave rouge par broyage dans l'eau acidifiée à l'acide citrique. Un plan d'expériences leur a permis d'optimiser le pH de l'eau (3-5), le ratio plante/eau (1 g/1-5 g de solvant), le temps d'extraction (2-10 min) et la température initiale de l'eau (30-70°C). D'après leurs résultats, les conditions optimales pour l'extraction des bétalaïnes sont 2 min d'extraction avec 1 g de betterave pour 5 g d'eau à pH 3 et 70°C [151]. Prakash Maran *et al.* ont optimisé par plan d'expériences l'extraction des bétalaïnes de la figue de Barbarie sous agitation. Les paramètres optimisés étaient le pH (3-7), le temps (20-120 min), la masse de plante (0,5-1,5 g) extraite dans 50 mL d'eau et la température (30-50°C). Contrairement aux résultats précédents, les conditions optimales étaient cette fois 115 min d'extraction à 60°C avec une masse de 1,2 g et un pH de 6,9 [154]. Malgré l'amélioration du rendement permis par l'acidification du pH, les solvants hydroalcooliques restent plus efficaces que l'eau seule dans ces conditions. En effet, Sanchez-Gonzales *et al.* ont comparé différents mélanges hydroalcooliques allant de 0% à 80% d'éthanol ou de méthanol dans l'eau acidifiée pour

## CHAPITRE I

l'extraction des bétalaïnes du joconostle (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber). Ils ont déterminé que le meilleur solvant était un mélange eau/méthanol (80/20) [155].

Comme les bétalaïnes, les anthocyanes sont plus stables et plus hydrosolubles à pH acide qu'à pH neutre [12]. Les acides citrique [156–159], chlorhydrique [153,160–162] et acétique [163,164] ont été utilisés pour diminuer le pH de l'eau lors de l'extraction. Cependant, comme pour les bétalaïnes, les solvants hydroalcooliques semblent plus efficaces que l'eau seule à pH acide lorsqu'une comparaison est décrite. En effet, Lao et Giusti ont comparé l'extraction des anthocyanes à partir de maïs violet (*Zea mays* L.) par macération dans l'eau, l'éthanol, le méthanol et des mélanges contenant 20-80% d'éthanol ou 70% d'acétone acidifiés avec 0,1% d'HCl à 6 M [153]. Les mélanges de solvants organiques et d'eau étaient plus efficaces que l'eau, mais le méthanol et l'éthanol étaient les solvants les moins efficaces. Afin d'observer l'effet de l'acidité sur l'extraction, les auteurs ont comparé la macération à l'eau avec 0,1-2% d'HCl. A partir de 1% d'acide, l'extraction des anthocyanes monomériques était augmentée, tandis que la concentration d'anthocyanes polymériques était diminuée, potentiellement suite à leur hydrolyse acide [153].

L'eau sulfurée est aussi beaucoup utilisée pour extraire les anthocyanes, notamment à partir du raisin [157,162–167]. L'un de ses intérêts est son pH acide, mais la présence de SO<sub>2</sub> dans l'eau affecterait aussi ses propriétés physico-chimiques, notamment en réduisant sa constante diélectrique [164]. Plusieurs études ont montré que le pH optimal pour l'extraction des anthocyanes était autour de 4, ce qui correspond au pH de l'eau sulfurée [157,165]. En revanche, Gartaula *et al.* ont déterminé que le pH (testé entre 4 et 9) n'avait pas d'impact sur l'extraction des calices de roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) [159].

Les naphthoquinones et anthraquinones sont généralement plus solubles dans l'eau à pH légèrement basique sous leur forme ionisée [168,169]. L'extraction de la lawsone dans une solution de carbonate de sodium à pH proche de 8 [168,170], ainsi que l'extraction de l'alizarine dans une solution d'hydroxyde de sodium à 5 g/L [171] ont ainsi été décrites.

La bixine est un colorant liposoluble présent dans les graines de roucou (*Bixa orellana* L.), qui peut être hydrolysée pour former la norbixine, un colorant hydrosoluble [172]. L'extraction conventionnelle à l'eau du roucou consiste en une macération à un pH légèrement basique, qui mène à l'extraction de la norbixine [172]. Handayani *et al.* ont cependant décrit l'extraction de la bixine à l'eau [173]. Ils ont comparé l'efficacité de l'extraction sous agitation

## CHAPITRE I

à 80°C dans l'eau à pH 4, 7 ou 9 pendant 5, 7,5 et 10 min. Le rendement en bixine était optimal après 7,5 min à pH 4 ou 7 et 10 min à pH 9 [173].

L'indigotine n'étant pas directement présente dans les plantes dont elle est extraite, elle est obtenue de manière conventionnelle en deux étapes : l'extraction de l'indoxyle, précurseur hydrosoluble de l'indigotine, puis sa transformation en indigotine par oxydation et dimérisation [174–178]. Lors de l'étape d'extraction, l'eau est généralement introduite entre 60 et 100°C, puis refroidie pour que l'extraction soit menée entre la température ambiante et 40°C [174,175,178]. Cette méthode permet d'endommager la surface des feuilles au début de l'extraction et inactiver les enzymes végétales, tout en évitant la formation de dérivés [175]. La transformation de l'indoxyle en indigotine est ensuite réalisée en ajoutant une base (ammoniaque, hydroxyde de calcium, chlorure de calcium) pour obtenir un pH entre 9 et 11. L'indigotine est alors obtenue sous la forme d'un précipité bleu insoluble dans l'eau [174–178].

### 2. Techniques d'éco-extraction

Différentes techniques d'éco-extraction ont été décrites pour l'extraction à l'eau des colorants végétaux. Ces méthodes permettent d'intensifier l'extraction sans ajouter d'adjuvant ou de co-solvant à l'eau. Le fonctionnement de ces différentes techniques est rapidement décrit avant le détail de leurs applications pour l'extraction à l'eau des colorants d'origine végétale. Pour les méthodes utilisées dans la suite de la thèse, les paramètres pouvant être optimisés sont aussi détaillés.

#### a. Extraction assistée par ultrasons

La propagation des ultrasons dans un solvant induit une succession de phases de compression à haute pression et de raréfaction à basse pression, qui force le déplacement des molécules [179,180]. Durant la phase de raréfaction, ce phénomène peut causer la formation de cavités appelées bulles de cavitation. Les bulles de cavitation vont alors s'élargir jusqu'à atteindre leur taille critique. Elles vont ensuite imploser, créant un point chaud de haute pression et haute température (50-1000 atm, 5000 K) ainsi qu'une onde de choc [179–181]. L'implosion des bulles de cavitation dégrade les parois cellulaires et facilite ainsi la libération des molécules dans le solvant. Elle permet ainsi d'accélérer l'extraction végétale [179–181]. L'extraction assistée par ultrasons (UAE) consomme moins d'énergie que les méthodes conventionnelles, et permet de diminuer le temps d'extraction et l'utilisation de solvants organiques. Elle peut

## CHAPITRE I

être efficace à plus faible température que les méthodes d'extraction conventionnelles, ce qui permet de protéger les molécules thermolabiles [179,181].

Lors du développement d'une méthode d'extraction assistée par ultrasons, plusieurs paramètres peuvent être contrôlés. Comme pour une extraction conventionnelle, le solvant, la durée d'extraction, la température, la granulométrie du végétal et le ratio plante/solvant peuvent avoir un impact majeur sur l'efficacité de l'extraction [180,181]. Cependant, des paramètres liés aux ultrasons peuvent aussi être optimisés. Selon les appareillages, il est possible de régler certains paramètres comme la fréquence (kHz), la puissance (W) ou encore l'amplitude des ultrasons. Une fréquence comprise entre 20 et 100 kHz est favorable à l'extraction végétale [180]. L'augmentation de la puissance ou de l'amplitude des ultrasons peut améliorer le rendement d'extraction en augmentant l'intensité des ultrasons (l'énergie transmise par seconde et par unité de surface), favorisant la dégradation des cellules végétales et l'efficacité de l'extraction. L'augmentation de l'amplitude permet aussi de favoriser l'extraction dans les solvants visqueux. Cependant, une amplitude élevée peut détériorer le transducteur ultrasonique et diminuer la transmission des ondes ainsi que le phénomène de cavitation [180,181]. L'UAE peut être réalisée dans un bain à ultrasons, dont la fréquence est généralement de 40 kHz ou dans un réacteur développé spécifiquement pour l'extraction, opérant à une fréquence autour de 20 kHz. Enfin, il est possible d'utiliser une sonde à ultrasons dont la fréquence est aussi généralement autour de 20 kHz, mais dont la surface d'émission réduite permet d'augmenter l'intensité des ultrasons [180]. Il est possible de travailler en mode continu ou par courtes périodes d'extraction (« pulses ») afin d'éviter la surchauffe du milieu d'extraction [180].

Plusieurs travaux décrivent l'extraction assistée par ultrasons de bétalaïnes à l'eau acidifiée [182–184] ou non [110,185–189]. Pérez-Loredo *et al.* ont utilisé les ultrasons comme pré-traitement (10-35 min, 20°C) avant une macération à l'eau pour extraire les bétalaïnes de la pulpe du pitaya rouge (*Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob.) [190]. Après 15 min de pré-traitement le rendement en bétalaïnes était 13% supérieur par rapport au contrôle sans pré-traitement [190].

Tabio-García *et al.* ont optimisé l'extraction des bétalaïnes à partir des parties aériennes de l'amaranthe (*Amaranthus hypochondriacus* var. Nutrisol) par UAE et ont obtenu après 10 min d'extraction à 40°C une concentration en bétalaïnes 1,39 fois supérieure à l'extrait obtenu

## CHAPITRE I

après une extraction sous agitation d'une heure à 50°C [182]. Leurs résultats ont aussi montré une dégradation des bétalaïnes lors du traitement par ultrasons au-delà de 40°C [182]. À la suite de l'optimisation par plan d'expériences de l'extraction des bétalaïnes d'épluchures de fruits du cactus raquette (*Opuntia engelmannii* cv. Valencia), Melgar *et al.* ont au contraire conclu que la température n'avait pas d'impact significatif sur l'extraction des bétalaïnes [186]. Enfin Prakash Maran *et al.* ont déterminé par plan d'expériences que l'extraction par UAE des bétalaïnes à partir des pétales de Bougainvillier était optimale à 55°C [191].

Borjan *et al.* ont comparé l'extraction des bétalaïnes de la betterave par UAE (40 kHz, 40°C, 90 min, 20 g/250 mL) avec de l'eau et des solvants composés de 30% de méthanol ou 50% de méthanol ou d'éthanol. Le meilleur rendement et la plus haute concentration en bétalaïnes ont été obtenues avec l'eau pure [110]. Fernando *et al.* ont aussi comparé l'eau à différents solvants hydroalcooliques à base d'éthanol et de méthanol (20-70%) et ils ont obtenu des résultats similaires quel que soit le solvant [185]. Pourtant, comme pour les méthodes conventionnelles, plusieurs études ont conclu que les mélanges hydroalcooliques étaient plus efficaces que l'eau pour extraire les bétalaïnes par UAE [183,184,186,192].

L'UAE à l'eau est aussi décrite pour l'extraction des anthocyanes [124,193–197] et de la braziléine [198,199]. Cependant, l'eau est encore une fois moins efficace lorsqu'elle est comparée à solvants organiques [124,198]. Backes *et al.* ont optimisé l'extraction assistée par ultrasons des anthocyanes de la figue par plan d'expériences. Ils ont étudié l'impact de la puissance (100-400 W), de la durée d'extraction (5-25 min) et de la proportion d'éthanol dans l'eau (0-100%) et déterminé que les conditions optimales d'extraction sont 21,3 min, 310,6 W et 100% d'éthanol. Ces conditions leur permettent d'obtenir un extrait plus riche en cyanidine que la macération [124].

Les anthraquinones aglycones et les naphtoquinones ne semblent pas être extraites efficacement à l'eau seule par UAE. En effet, Sharma *et al.* n'ont pas pu détecter la juglone dans des extraits aqueux de feuilles de noyer (*Juglans regia* L.) [141] et Jiao *et al.* ont obtenu de faibles concentrations d'émodyne et de physcion à partir de la renouée à fleurs multiples (*Reynoutria multiflora* (Thunb.) Moldenke ou *Polygonum multiflorum* Thunb.) [149].

Les ultrasons ont été utilisés par Kha *et al.* pour assister l'extraction de l'huile de gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.), riche en carotène et lycopène [200]. Ils ont aussi été utilisés pour intensifier l'extraction à l'eau des crocines [134,201–203]. Cependant, pour ces

## CHAPITRE I

dernières, les mélanges hydroalcooliques contenant approximativement 50% d'éthanol ou de méthanol sont à nouveau plus efficaces que l'eau seule [134,202].

### **b. Extraction assistée par micro-ondes**

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques de basse fréquence (300 MHz-300 GHz). Les micro-ondes utilisés pour l'extraction, tout comme les micro-ondes domestiques, opèrent à une fréquence de 2450 MHz [181,204].

Lorsque les micro-ondes sont absorbées par un matériau, leur énergie électromagnétique est transformée en énergie thermique. Cette production d'énergie est causée par deux phénomènes souvent concomitants : la conduction ionique et la rotation dipolaire. La conduction ionique correspond au déplacement électrophorétique d'ions chargés dans la matrice sous l'influence des micro-ondes. La résistance de la solution à ce flux d'ions et la collision des molécules génère de la friction qui se traduit par le réchauffement de la solution. La rotation dipolaire cible spécifiquement les molécules polaires possédant un moment dipolaire. Ces composés ont la particularité de s'aligner sous l'influence d'un champ électrique. Sous l'effet des micro-ondes, la rotation des dipôles va causer une oscillation constante des molécules dipolaires, ce qui va fragiliser les liaisons hydrogène dans la solution et générer de la chaleur [181,204]. Cette production de chaleur ne concerne que les molécules dipolaires capables de dissiper l'énergie électromagnétique. Cette capacité est définie par le facteur de dissipation ( $\tan \delta$ ), qui dépend de la constante diélectrique  $\epsilon'$  et de la perte diélectrique  $\epsilon''$  ( $\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$ ). Ainsi, certains solvants, comme l'hexane, sont dits transparents aux micro-ondes et ne chauffent pas sous leur effet [204].

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) permet de chauffer la matière de l'intérieur et sans inertie, induisant un gradient de température dirigé vers l'extérieur qui permet d'améliorer la diffusivité des molécules. Elle permet ainsi une extraction efficace en quelques minutes voire quelques dizaines de secondes, tout en diminuant la consommation de solvant et d'énergie [204]. Comme pour l'UAE, il est possible d'optimiser certains paramètres spécifiques aux micro-ondes lors du développement d'une extraction assistée par micro-ondes. L'extraction peut être réalisée dans un réacteur ouvert ou un réacteur fermé. Dans le second cas de figure, la pression augmente durant l'extraction, jusqu'à un maximum dépendant du réacteur et pouvant aller jusqu'à 100 bars, mais plus communément autour de 15 bars [204]. Le solvant peut alors dépasser sa température d'ébullition tout en restant à

## CHAPITRE I

l'état liquide. Dans le cas de l'eau, l'extraction est ainsi réalisée dans des conditions subcritiques, permettant de diminuer la polarité de l'eau et d'accéder à des composés moins polaires [205]. La puissance d'extraction varie généralement entre 200 et 1000 W pour l'extraction végétale. L'augmentation de la puissance permet de diminuer le temps d'extraction en augmentant son efficacité, mais elle peut aussi causer une surpression ou une surchauffe du milieu d'extraction. Pour éviter cela, l'extraction peut être réalisée par une succession de cycles courts de l'ordre de la dizaine de secondes [204].

L'extraction des bétalaïnes par MAE a été décrite dans l'eau [186,189,206–209] et l'eau acidifiée à l'acide ascorbique pour améliorer leur stabilité [210,211]. Zin et Bánvölgyi ont optimisé l'extraction des bétalaïnes à partir d'épluchure de betterave en utilisant l'extraction assistée par micro-ondes avec de l'eau ou un mélange hydroalcoolique contenant 15% d'éthanol, acidifiés ou non. Ils ont obtenu une extraction optimale des bétalaïnes après 150 s d'extraction à 800 W en mode intermittent pour éviter une trop grande élévation de température en utilisant l'eau comme solvant [211]. Melgar *et al.* ont obtenu des résultats similaires lors de l'optimisation par plan d'expériences de l'extraction par MAE des épluchures de cactus raquette. L'optimisation du pourcentage de méthanol dans le solvant d'extraction (0-100%) leur a en effet permis de déterminer que l'eau était plus efficace que le méthanol et les mélanges méthanol/eau [186]. En revanche, l'extraction était moins efficace que l'UAE avec 35% de méthanol [186]. Les micro-ondes ont aussi été utilisés comme pré-traitement avant des extractions par macération à l'eau [190,208]. Cette méthode s'est alors montrée plus efficace que les traitements thermiques [208] et les enzymes [190], mais moins efficace que les ultrasons [190].

L'extraction assistée par micro-ondes a aussi été décrite pour l'extraction des anthocyanes [194,212,213]. Vidana Gamage et Choo ont optimisé l'extraction assistée par micro-ondes des anthocyanes des fleurs de pois bleu (*Clitoria ternatea* L.) et ont obtenu de meilleurs résultats que la macération, les ultrasons et les enzymes [194].

Pour les anthraquinones, Arvindekar *et al.* ont obtenu un meilleur rendement à partir de la rhubarbe (*Rheum emodi*) par une solution aqueuse de NaOH 0,5 M, comparé à l'éthanol, le méthanol, l'acétonitrile, l'acétate d'éthyle, l'acétone et le chloroforme [214]. De plus, dans les travaux présentés dans la suite de cette thèse sur la garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.), l'eau était aussi efficace qu'un mélange hydroalcoolique (éthanol 50%) lors de l'extraction

## CHAPITRE I

assistée par micro-ondes et près de deux fois plus efficace que le soxhlet avec le même solvant hydroalcoolique [205]. Buyukakinci et Karadag ont réalisé l'extraction des anthraquinones de la garance des teinturiers par MAE à l'eau à 100 W et 90°C avec 10 g/100 mL. Ils ont déterminé que 5 min d'extraction permettaient d'obtenir une meilleure concentration en alizarine, l'anthraquinone principale de la plante que 10 ou 15 min [215]. Barrera-Vasquez *et al.* ont utilisé les micro-ondes comme prétraitement à une extraction par liquide pressurisé à l'eau. Ce pré-traitement leur a permis d'améliorer de 28% la masse d'anthraquinones dans l'extrait sec [216]. Concernant les naphtoquinones, Zohourian *et al.* ont décrit une méthode d'extraction de la lawsone à partir du henné en 1 min à 600 W [217], tandis que Sharma *et al.* n'ont pas pu extraire la juglone des feuilles de noyer par MAE à l'eau [141]. La MAE a aussi été décrite pour l'intensification de l'extraction de la crocine [218], de la bixine [219] et de l'indigo [220].

### c. Extraction à haute pression

L'utilisation de hautes pressions à chaud, ou extraction par liquides pressurisés (PLE), permet d'affaiblir les liaisons hydrogènes de l'eau et ainsi de diminuer sa constante diélectrique pour approcher celle du méthanol [10,12]. De plus, lorsque la pression augmente au dessus de la pression atmosphérique ( $\approx 0,1$  MPa), il est possible d'augmenter la température de l'eau liquide au-delà de 100°C. Elle est alors à l'état subcritique et se rapproche de l'état supercritique qui est atteint lorsque les conditions de température et de pression dépassent le point critique (22,1 MPa, 374°C) (Figure I-22). Dans l'état subcritique, la viscosité de l'eau et sa tension de surface sont diminuées, ce qui permet d'améliorer sa diffusivité [10,12,98]. De plus, l'augmentation de la pression permet de dégrader les membranes cellulaires et ainsi de rendre plus accessibles les composés cibles [98]. Cette catégorie regroupe plusieurs techniques, dont l'optimisation repose principalement sur les réglages de température et de pression, ainsi que sur la durée et le nombre de cycles d'extraction.

## CHAPITRE I

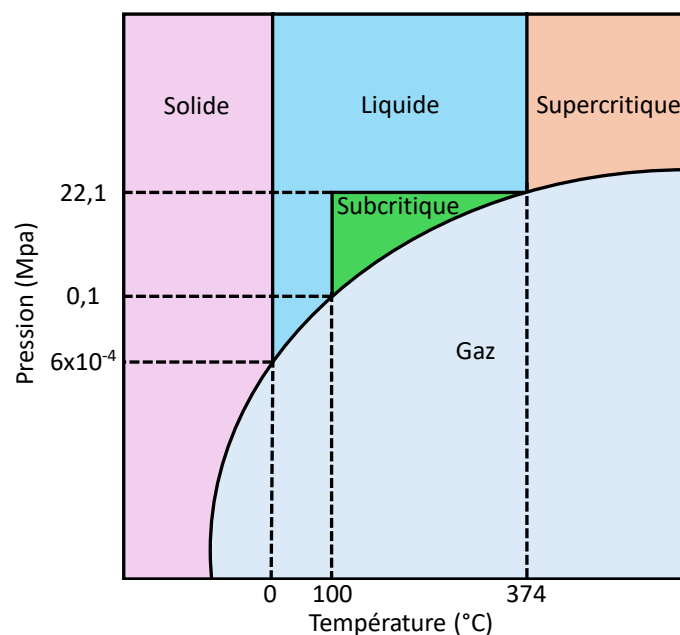


**Figure I-22 :** Schéma du diagramme de l'eau représentant les seuils de température et de pression des différents états de l'eau adapté de Zhang *et al.* [221].

L'extraction par liquide pressurisé a été décrite pour les anthocyanes à l'eau avec ou sans ajout d'acide et de  $\text{SO}_2$  [208,222–225]. Garcia-Mendoza *et al.* ont comparé plusieurs solvants pour l'extraction à l'eau sous haute pression des anthocyanes à partir de co-produits de transformation du fruit du jujara (*Euterpe edulis* Mart.). L'eau acidifiée (pH 2) était plus efficace que l'eau pure, l'éthanol et un mélange éthanol/eau (50/50) [223]. L'extraction des anthocyanes par PLE à 10 MPa était optimale à 40°C, une température plus élevée causant leur dégradation. A cette température, l'eau n'est pas dans un état subcritique, mais cette méthode s'est révélée plus efficace que la macération et l'extraction assistée par ultrasons dans un solvant hydroalcoolique (éthanol/eau, 50/50) [223]. Ju et Howard ont aussi comparé la PLE à l'eau et à l'eau sulfurée à l'UAE à l'eau et avec un mélange hydroalcoolique (méthanol/eau, 60/40) [166]. La PLE à l'eau sulfurée à 100°C était la méthode la plus efficace pour extraire les anthocyanes de la peau de raisin, devant l'UAE hydroalcoolique et la PLE à l'eau [166].

Plusieurs méthodes d'extraction des anthraquinones à l'eau subcritique ont été décrites [216,226–228]. Pongnaravane *et al.* ont comparé l'extraction des anthraquinones des racines du nono (*Morinda citrifolia* L.) à l'eau subcritique avec l'UAE et le soxhlet à l'éthanol. L'extraction à l'eau subcritique était aussi efficace que le soxhlet et plus efficace que l'UAE [226].

## CHAPITRE I

Muangrat *et al.* ont optimisé l'extraction par liquides pressurisés de la braziléine à 0,2 MPa, en faisant varier le temps d'extraction, le ratio plante/solvant, la température et le ratio d'éthanol dans l'eau (eau pure, 1/3, 1/1, 3/1 ou éthanol pur) [229]. Les paramètres d'extraction optimaux étaient 120°C pendant 60 min avec 9 g de plante par gramme de solvant. Dans ces conditions, les mélanges hydroalcooliques et l'éthanol étaient cependant plus efficaces que l'eau pour extraire la braziléine [229].

Plusieurs méthodes d'extraction à l'eau subcritique ont été décrites pour l'extraction de la curcumine [230–238]. Mohammadi *et al.* ont optimisé l'extraction de la curcumine par PLE à 2 MPa pendant 20 min entre 90 et 150°C avec de l'eau additionnée de 0-10% d'éthanol. Les conditions optimales obtenues étaient de 150°C avec 10% d'éthanol, ce qui montre que la curcumine reste peu soluble dans l'eau, même subcritique. Euterpio *et al.* ont optimisé l'extraction de la curcumine avec un tampon phosphate, afin d'améliorer la solubilité et la stabilité de la curcumine. Ils ont déterminé que l'extraction était optimale à pH 1,5, où la curcumine est sous forme protonée et donc plus hydrosoluble [235]. L'extraction à l'eau subcritique a aussi été utilisée pour optimiser l'extraction des crocines du safran [239].

La pascalisation est une méthode de traitement à haute pression utilisée dans l'industrie alimentaire pour conserver les aliments. L'application d'une haute pression (autour de 600 MPa) pendant un temps court (quelques minutes) et à température généralement ambiante permet en effet d'inactiver les enzymes et les micro-organismes. Cette méthode est aujourd'hui parfois utilisée pour extraire certains composés car elle permet de réduire le temps d'extraction et l'utilisation de solvants organiques [240]. Elle a notamment été utilisée pour extraire la crocine du safran [241].

### **d. Méthodes électrochimiques et irradiation gamma**

L'application d'un champ électrique pulsé (PEF) de haut voltage (kV) en séries de courte durée (de l'ordre de la nanoseconde ou de la milliseconde) permet de dégrader les parois cellulaires et ainsi de faciliter l'extraction. Cette méthode d'extraction est rapide et peu coûteuse en énergie par rapport aux méthodes conventionnelles [98,181,240].

L'application d'un champ électrique pulsé a été décrite comme une méthode de prétraitement avant l'extraction à l'eau (acidifiée ou non) des bétalaïnes de la betterave rouge [242–244]. Elle permet de réaliser une extraction plus efficace tout en diminuant la

## CHAPITRE I

température d'extraction (<60°C), ce qui limite la dégradation des bétalaïnes lors de l'extraction [242].

Puértolas *et al.* ont optimisé l'extraction des anthocyanes de pomme de terre vitelotte (*Solanum tuberosum* 'Vitelotte') par chauffage sous agitation dans un solvant acidifié (eau, éthanol 48% ou éthanol 96%) à trois températures (10, 25 et 40°C) avec ou sans un prétraitement par PEF [245]. Avec ou sans prétraitement l'augmentation du pourcentage d'éthanol dans le solvant améliorait le rendement en anthocyanes dans l'extrait. Cependant, les rendements obtenus après le prétraitement par PEF étaient plus élevés que ceux sans prétraitements. Ainsi le traitement par champ électrique pulsé a permis de s'affranchir de l'utilisation d'éthanol, tout en obtenant un extrait plus riche que la référence sans prétraitement [245]. Medina-Meza et Barbosa-Cánovas ont comparé l'extraction assistée par champ électrique pulsé à l'eau avec l'UAE et l'extraction sous agitation sur du raisin (*Vitis vinifera* L.) et des prunes (*Prunus domestica* var. Casselman) [193]. L'extraction des anthocyanes du raisin était plus efficace par PEF que par ultrasons ou simple agitation. En revanche, pour les prunes, l'UAE à 50°C était la méthode la plus efficace [193].

Le chauffage ohmique est une méthode de chauffage non conventionnelle utilisant le passage d'un courant électrique pour générer de la chaleur par effet Joule. La transformation du courant électrique en énergie thermique dépend de la conductivité électrique du milieu, ainsi que de la taille des particules [240].

Perreira *et al.* ont utilisé le chauffage ohmique comme méthode de prétraitement avant la macération à l'eau des anthocyanes de la pomme de terre Vitelotte [246] et du raisin [247]. Dans les deux applications, ce prétraitement a permis d'améliorer le rendement d'anthocyanes par rapport à l'extraction sans prétraitement, mais aussi par rapport au prétraitement par chauffage conventionnel réalisé dans les mêmes conditions de temps et de température [246,247]. L'extraction assistée par chauffage ohmique a été décrite pour l'extraction des bétalaïnes de la betterave [248] et des anthocyanes du raisin [249]. Cependant, dans ces travaux, les mélanges éthanol/eau étaient plus efficaces que l'eau seule pour extraire les colorants d'intérêt [248,249].

L'irradiation gamma est utilisée, entre autres, pour la stérilisation des aliments. Il a été déterminé qu'une dose inférieure à 10 kGy n'amenait pas de toxicité ou de perte de qualité

## CHAPITRE I

des aliments. En revanche, l'irradiation gamma cause des dommages aux structures cellulaires, ce qui augmente la perméabilité des cellules et peut faciliter l'extraction [250].

Nayak *et al.* ont utilisé l'irradiation gamma comme méthode de prétraitement avant l'extraction à l'eau acidifiée (pH 3) des bétalaïnes de la betterave rouge. Cette méthode leur a permis d'améliorer le rendement en bétalaïnes, mais pas leur stabilité [251].

### 3. Extraction assistée chimiquement ou par enzyme

Certaines méthodes d'extraction décrites s'appuient sur l'ajout d'un co-solvant ou d'un adjuvant à l'eau. Ces méthodes permettent généralement de diminuer la polarité du solvant d'extraction afin d'accéder à des composés moins polaires. Cette catégorie comprend aussi l'extraction enzymatique, dans laquelle l'ajout d'enzymes permet de détruire les composants des parois cellulaires et ainsi de faciliter la diffusion des composés dans l'eau. Les solvants eutectiques et liquides ioniques n'ont pas été considérés comme des solvants aqueux, quelle que soit la proportion d'eau qu'ils contenaient. En effet, l'eau est principalement utilisée pour diminuer la viscosité de ces solvants et n'est donc pas leur composant principal.

#### a. Ajout de co-solvants verts

L'ajout d'un co-solvant dans l'eau peut permettre de diminuer sa constante diélectrique et ainsi de faciliter l'extraction de composés moins polaires, mais peut aussi impacter d'autres propriétés physico-chimiques permettant de faciliter l'extraction (viscosité, tension de surface etc.) [12]. Les co-solvants les plus utilisés dans l'eau sont les alcools, notamment l'éthanol et le méthanol. Bien que l'éthanol puisse être considéré comme un solvant vert, les mélanges hydroalcooliques ont plutôt été considérés comme des solvants conventionnels et ont servi de références afin de comparer l'efficacité des techniques d'éco-extraction décrites.

L'utilisation d'alcools alternatifs (glycérol, propanediol, et butanediol principalement) pour l'extraction de colorants végétaux est aussi parfois décrite. Ces solvants sont notamment utilisés en cosmétique comme solvants ou humectants et ont une polarité intermédiaire entre l'éthanol et l'eau [60,93]. Le glycérol est un solvant vert polaire régulièrement associé à l'eau afin d'améliorer la stabilité de l'extrait car il a des propriétés bactériostatiques. De plus son mélange avec l'eau permet de diminuer sa viscosité, pour obtenir un solvant d'extraction efficace. Compte tenu de sa température d'ébullition élevée, l'élimination du glycérol de l'extrait est difficile et coûteuse en énergie. Il est donc recommandé de le conserver dans l'extrait final, où il peut agir comme un stabilisant [252,253].

## CHAPITRE I

Le glycérol aqueux, acidifié ou non, a été particulièrement décrit pour l'extraction des polyphénols, incluant notamment les anthocyanes [253–261]. Fu *et al.* ont optimisé l'extraction des anthocyanes à partir de co-produits de myrtille (*Vaccinium* spp.) par UAE avec une solution de glycérol acidifiée (0,1% acide hydrochlorique). Un plan d'expériences leur a permis d'optimiser le ratio solvant/plante (5-40 mL/g), la proportion de glycérol (0-50%), ainsi que la puissance (30-300 W) et la durée d'extraction (20-80 min) [254]. Le rendement en anthocyanes le plus élevé a été obtenu avec 20% de glycérol et 18,6 mL de solvant/g de plante, à 174 W pendant 40 min. L'extrait obtenu dans ces conditions a montré une meilleure stabilité qu'un extrait méthanolique [254]. Kowalska *et al.* ont comparé différentes proportions de glycérol dans l'eau (30-80%) à l'eau, l'éthanol et un mélange éthanol/eau (50/50) pour l'extraction par sous agitation (20-80°C, 2 g/100 mL, 10 min) des anthocyanes des baies d'aronia (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) et de sureau (*Sambucus nigra* L.) [255]. Quelle que soit la température d'extraction, les auteurs ont obtenu une concentration en anthocyanes plus élevée avec le solvant glycérol/eau qu'avec l'éthanol ou l'eau. Pour la baie de sureau, les solvants glycérol 30% et 50% permettent d'obtenir des résultats optimaux, similaires au solvant éthanol 50%. Cependant, pour la baie d'aronia l'éthanol 50% est plus efficace que tous les autres solvants [255].

Mehta *et al.* ont optimisé l'extraction des bétalaïnes de la figue de barbarie en utilisant un plan d'expériences. Ils ont ainsi optimisé la proportion de glycérol dans l'eau (20-50%), le ratio plante/eau (1/10-1/20), la température (30-60°C) et la durée d'extraction (10-30 min). Les conditions optimales pour obtenir la concentration en bétalaïnes la plus élevée sont 23,15% de glycérol, un ratio de 1/10 et une extraction de 10,4 min à 31,15°C [262].

Kowalska *et al.* ont décrit l'utilisation d'un mélange glycérol/eau (30-80%) pour l'extraction de la chlorophylle de l'ortie et de la menthe poivrée. Le ratio le plus faible de glycérol (30%) est le plus efficace et permet une meilleure extraction de la chlorophylle que l'eau seule. Cependant, l'éthanol permet une meilleure extraction de la chlorophylle que le mélange glycérol/eau [150].

Les autres alcools alternatifs ont été peu décrits pour l'extraction des colorants à partir des plantes terrestres, bien que quelques études récentes s'y intéressent pour extraire les anthocyanes [257,263]. Soares *et al.* ont comparé plusieurs solvants pour l'extraction des anthocyanes du fruit de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) dans le cadre d'une valorisation

## CHAPITRE I

cosmétique [263]. Pour cela, ils ont d'abord optimisé une méthode par UAE et une méthode par liquide pressurisé avec un solvant à base de 1,2-propanediol aqueux en utilisant une méthodologie par plan d'expériences. Le rendement en anthocyanes le plus élevé a été obtenu par UAE à 160 W pendant 10 min, avec 42,6% de 1,2-propanediol dans l'eau à un pH de 7. Ces conditions ont ensuite été utilisées pour réaliser l'extraction avec d'autres solvants (en solution aqueuse à 42,6%) : 1,2-éthanediol, 1,2-butanediol, 1,2-pentanediol, 1,2-hexanediol, 1,3-diméthoxypropan-2-ol, 1,3-diéthoxypropan-2-ol et 3-éthoxypropane-1,2-diol. Des extraits ont aussi été réalisés avec de l'eau et de l'éthanol pur et utilisés comme référence. Tous les solvants alternatifs ont permis d'obtenir un rendement en anthocyanes supérieur ou égal à l'éthanol et largement supérieur à l'eau. Le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'hexanediol [263].

Les huiles végétales sont des agro-solvants apolaires non toxiques et biodégradables pouvant être inclus dans les formulations finales de produits alimentaires ou cosmétiques [264].

Pour extraire le  $\beta$ -carotène de la carotte après un prétraitement par PEF, Roohinejad *et al.* ont préparé une microémulsion huile dans l'eau à partir de 50% de tampon phosphate (pH 6,8), de 30% de Capmul MCM (triglycérides à chaînes moyennes) et de 20% de Tween 80 (tensioactif). Grâce à un plan d'expériences, les auteurs ont déterminé les conditions optimales d'extraction : 49,4 min, 52,2°C et 1/70 (carotte/microémulsion, m/m) [265].

Van Chuyen *et al.* ont réalisé l'extraction séquentielle de la bixine dans l'huile de soja et dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium. La combinaison des solvants a été réalisée dans l'ordre eau puis huile et dans l'ordre huile puis eau avec 30 min d'extraction par solvant et comparée aux rendements obtenus après 60 min dans chaque solvant seul. La combinaison des deux solvants était plus efficace que l'utilisation d'un seul solvant. Les meilleurs résultats ont été obtenus par la combinaison commençant par l'extraction dans l'eau, car la réhydratation des graines a causé des changements de structure à leur surface facilitant l'extraction à l'huile [266].

### **b. Cyclodextrines**

Les cyclodextrines sont des composés amphiphiles dérivés de l'amylose capables de former des complexes d'inclusion. La structure des cyclodextrines forme une cavité lipophile, tandis que leur surface extérieure est hydrophile [12]. Elles permettent d'améliorer la solubilité des

## CHAPITRE I

composés dans l'eau, mais aussi leur stabilité et leur biodisponibilité. Ainsi, elles ont un intérêt lors de l'extraction, mais aussi dans la valorisation de l'extrait [12].

Tutunchi *et al.* ont utilisé la  $\beta$ -cyclodextrine pour l'extraction des bétalaïnes de la betterave [267]. L'eau avec cyclodextrine était plus efficace que l'eau seule, l'éthanol seul ou l'éthanol avec cyclodextrines pour l'extraction des bétalaïnes [267]. L'utilisation de  $\beta$ -cyclodextrines a été décrite pour l'extraction des anthocyanes de la peau d'oignon [261,268]. Bozinou *et al.* ont ainsi comparé différentes  $\beta$ -cyclodextrines et déterminé que la  $\beta$ -cyclodextrine était plus efficace pour l'extraction des anthocyanes que ses dérivés (hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine et méthyl- $\beta$ -cyclodextrine), que l'eau pure et que les mélanges hydroalcooliques contenant 90% de glycérol ou 60% d'éthanol [268].

### c. Tensioactifs

Les tensioactifs sont des composés amphiphiles capables de former des micelles dans l'eau lorsque leur concentration est supérieure à la concentration micellaire critique [12]. Les molécules apolaires peuvent alors se loger dans les micelles, leur phase interne correspondant à la partie apolaire des tensioactifs, ce qui permet d'extraire des composés apolaires en solution aqueuse. De plus, les composés apolaires peuvent ensuite être concentrés par extraction au point trouble. En effet, en chauffant la solution au-delà du point de trouble, le tensioactif et l'eau deviennent non miscibles et peuvent être séparés par centrifugation [12].

Les chlorophylles peuvent être extraites par des solutions de tensioactifs avec une efficacité proche de celle des solvants organiques et une plus grande sélectivité [269,270]. Leite *et al.* ont comparé différents tensioactifs non ioniques pour l'extraction des chlorophylles de l'épinard (*Spinacia oleracea* L.) [269]. Les tensioactifs possédant une HLB (balance hydrophile-lipophile) entre 10 et 13 étaient les plus efficaces pour l'extraction des chlorophylles. Le rendement en chlorophylle avec ces tensioactifs était légèrement plus faible qu'avec l'éthanol à 80%, mais plus élevé qu'avec les autres solvants organiques (éthanol, éthanol 60%, butanol, propanol) et la sélectivité envers la chlorophylle a était bien plus élevée [269].

L'extraction par une solution aqueuse de tensioactifs non ioniques a aussi été décrite pour les anthraquinones [271–274]. Kiathevest *et al.* ont comparé l'extraction sous agitation, l'UAE et l'extraction à l'eau chaude sous pression en utilisant du Genapol X-080 (0-20%) ou du Triton C-100 (0-20%) comme solvant d'extraction. La méthode optimale pour extraire les anthraquinones des racines du nono était l'extraction à l'eau chaude sous pression (80°C, 4

## CHAPITRE I

MPa) avec 1% de Triton X-100 [271]. Shi *et al.* ont utilisé l'extraction assistée par ultrasons avec une solution de Genapol X-080 (0,5-15%), comparée à différents solvants organiques. L'extraction des anthraquinones de la rhubarbe était optimale en utilisant une solution de Genapol X-080 à 10% [272].

De Souza Mesquita *et al.* ont décrit l'extraction des caroténoïdes des co-produits issus du fruit du palmier pêche (*Bactris gasipaes* Kunth) avec des solutions aqueuses de différents tensioactifs à 250 mM [275]. Tous les tensioactifs ont permis d'obtenir un rendement en caroténoïdes plus élevé que l'éthanol ou l'acétone dans les mêmes conditions d'extraction (90 min, ratio plante/solvant de 1/10, température ambiante). Le rendement le plus élevé a été obtenu avec la solution de Bromure de (1-Décyl)triméthylammonium [275].

### d. Extraction enzymatique

Les enzymes sont des protéines actives biosynthétisées par les organismes vivants. Certaines peuvent être utilisées pour dégrader les cellules végétales en hydrolysant les polysaccharides, les protéines ou la lignine [12]. Les plus utilisées sont la cellulase et la pectinase, capables de décomposer respectivement la cellulose et la pectine. Les solutions d'enzymes rentrent dans la catégorie des solvants verts, mais leur utilisation peut s'avérer coûteuse et chaque enzyme nécessite une température et un pH spécifique [12,98].

L'utilisation d'enzymes a été décrite pour l'extraction des bétalaïnes [276,277]. Gengatharan *et al.* ont comparé l'utilisation de pectinase (10 292 PGU/mL, 0-2,5%) dans l'eau ou des mélanges hydroalcooliques (éthanol 50-95%) pour l'extraction des bétacyanines de la pulpe du pitaya rouge avec un ratio plante/solvant de 1/1 ou 1/2 pendant 2 h à température ambiante, sans contrôle du pH [276]. Les conditions optimales d'extraction étaient 1,5% de pectinase dans l'eau et un ratio de 1/1. L'ajout de 1,5% de pectinase dans l'eau a permis de doubler le rendement en bétacyanines [276]. Les enzymes ont aussi été utilisées comme méthode de prétraitement à l'extraction du pitaya [190] et de la betterave [185], mais elles n'ont pas permis d'améliorer l'extraction des bétalaïnes.

L'extraction enzymatique a aussi été décrite pour l'extraction des anthocyanes du raisin [278] et des fleurs de pois bleu [194]. Vidana Gamage *et al.* ont comparé l'efficacité de l'extraction enzymatique avec de la pectinase (activité enzymatique de 3 800 PGU/mL, 1,5%, 40°C, pH non contrôlé, 30 min) à celle de l'UAE, de la MAE et de l'extraction sous agitation à l'eau. L'extraction enzymatique était la moins efficace pour extraire les anthocyanes des fleurs de

## CHAPITRE I

pois bleu [194]. Cabeza *et al.* ont décrit l'utilisation d'un mélange de pectinase (6 302 PGU/mg) et de Surfactin (un tensioactif d'origine bactérienne) pour l'extraction des anthocyanes de la peau de raisin (pH 5, 30°C, 2 h). Ce mélange était plus efficace que l'eau seule, ou qu'une solution ne contenant que la pectinase ou le Surfactin [278].

Les enzymes sont décrites pour l'extraction de l'huile de palme riche en caroténoïdes [279–281]. Teixeira *et al.* ont utilisé une solution d'enzymes (pectinase/cellulase/tannase (1/1/1) à une concentration de 4%) pour assister l'extraction de l'huile de palme (pH 4, 50°C, 1 h), ce qui leur a permis d'augmenter le rendement en huile, mais aussi la concentration en caroténoïdes dans l'huile de 153% [279]. Noorshamsiana *et al.* ont décrit une concentration en carotène près de 5 fois supérieure dans l'huile extraite avec la solution d'enzymes (cellulase, 200 unités/g d'enzyme) à pH 5,6 et 55°C pendant 20 minutes sous ultrasons puis 3 h d'hydrolyse enzymatique. Ils ont aussi mentionné que l'huile obtenue était de moins bonne qualité, ce qu'ils ont attribué à son oxydation lors des 3 h d'extraction enzymatique [281]. Enfin, Abd Rashid *et al.* décrivent une amélioration du rendement en huile, mais pas de la richesse en caroténoïdes dans l'huile extraite avec la solution d'enzymes (pectinase, 4,5%, 40°C pendant 24 h sans contrôle de pH) [280].

### 4. Conclusions

Bien que certains colorants végétaux puissent être extraits à l'eau acidifiée ou non en utilisant les méthodes d'extraction conventionnelles, les solvants organiques sont le plus souvent plus efficaces, même pour les colorants les plus polaires (Figure I-23). L'extraction assistée par ultrasons permet de diminuer le temps d'extraction et d'intensifier l'extraction, mais comme les méthodes conventionnelles, elle ne permet pas de s'affranchir des solvants organiques. L'extraction assistée par micro-ondes et les techniques d'extraction sous pression permettent au contraire de réaliser des extractions à l'eau dont l'efficacité rivalise avec les solvants de référence pour une grande partie des colorants polaires (Figure I-23). L'ajout de différents co-solvants verts, d'adjuvants (cyclodextrines ou tensioactifs) ou d'enzymes permet enfin de d'extraire les colorants polaires ou apolaires (Figure I-23). Ainsi, l'extraction à l'eau peut être utilisée pour extraire tout type de colorants végétaux en utilisant la méthode et les modificateurs de solvant adaptés.

En cosmétique, l'utilisation de l'eau et de solutions contenant des ingrédients cosmétiques comme les co-solvants décrits précédemment ou des tensioactifs permettent d'obtenir un

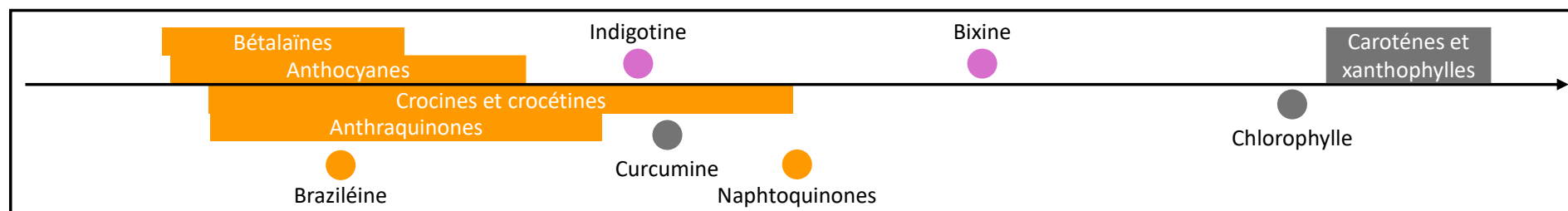
## CHAPITRE I

extrait riche pouvant être directement valorisé. Il est alors possible d'éviter l'étape de séchage de l'extrait, coûteuse en énergie et d'obtenir un ingrédient multifonctionnel pouvant agir comme colorant, mais aussi comme solvant, humectant, agent hydratant ou actif en fonction de sa composition.

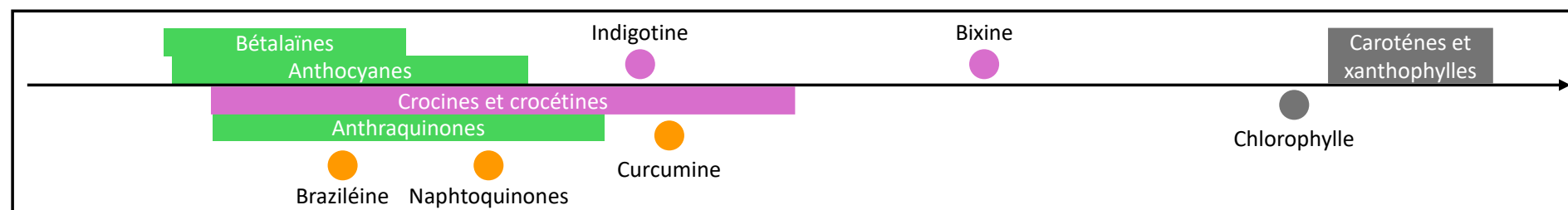
Au-delà de développer des méthodes d'extraction efficaces, il est nécessaire de surveiller la stabilité des extraits. En effet, les micro-organismes et enzymes pouvant dégrader les composés d'intérêt ou dénaturer l'extrait sont actifs lorsque l'activité de l'eau (c'est-à-dire la quantité d'eau disponible dans le milieu) est élevée. De plus, la présence d'eau facilite l'oxydation, un facteur de dégradation auquel de nombreux colorants sont sensibles.

## CHAPITRE I

A : Extraction conventionnelle à l'eau (avec ou sans acide) et UAE



B : MAE et PLE



C : Ajout de co-solvants, d'adjuvants ou d'enzymes dans l'eau

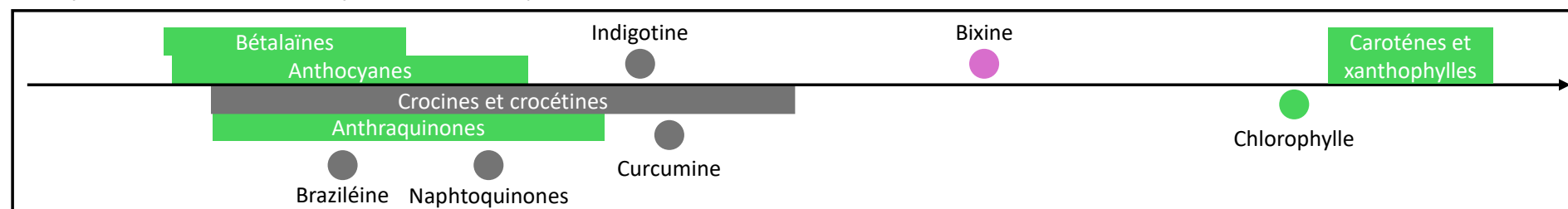


**Figure I-23 :** Résumé de l'efficacité des méthodes d'extraction des colorants végétaux décrites, basé sur un schéma simplifié de la Figure I-21 qui représente la polarité des principaux colorants végétaux décrits. Les méthodes d'extraction dont l'efficacité est comparable ont été regroupée. A : Extractions conventionnelles et UAE, B : MAE et PLE, C : méthodes basées sur l'ajout de co-solvant, d'adjuvants ou d'enzymes. En vert, les colorants généralement extraits plus efficacement par la méthode aqueuse que par les solvants de référence, en orange les colorants généralement extraits plus efficacement par les solvants de référence en violet les colorants pour lesquels au moins une méthode aqueuse est décrite, mais sans comparaison avec un solvant de référence et en gris les colorants pour lesquels la méthode aqueuse n'a pas été décrite.

### IV. Stratégie de la thèse

L'entreprise Terre de Couleur est une entreprise cosmétique spécialisée dans les soins et colorations capillaires à base d'ingrédients naturels. L'objectif de cette thèse était donc d'optimiser des méthodes d'extraction à l'eau de plantes tinctoriales afin de développer de nouveaux ingrédients performants et éco-responsables, riches en colorants et en actifs et qui soient si possible directement formulables. Pour cela, trois plantes contenant des colorants de polarités différentes, ainsi que d'autres composés d'intérêt cosmétique ont été étudiées.

La racine de garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.) est riche en anthraquinones, des colorants de polarité moyenne. D'après la littérature, la possibilité d'extraire ces colorants en avec de l'eau nécessite d'abaisser la polarité de l'eau en utilisant une haute pression et/ou une température élevée. Une extraction assistée par micro-ondes, technique d'éco-extraction permettant de répondre à ce critère, a été développée afin d'extraire les anthraquinones glycosylées et non glycosylées en utilisant uniquement de l'eau.

La graine de roucou (*Bixa orellana* L.) permet d'obtenir un colorant riche en bixine, un apocaroténoïde. De plus, elle contient d'autres composés d'intérêt polaires (composés phénoliques), et apolaires (tocotriénols, terpènes volatils). Afin d'extraire simultanément tous ces composés, une extraction à l'eau seule n'est pas envisageable. En revanche une extraction par un mélange biphasique eau/huile végétale devrait permettre d'extraire les actifs polaires dans la phase aqueuse et le colorant et les actifs non polaires dans la phase huileuse. L'extraction assistée par ultrasons a alors été utilisée pour intensifier l'extraction, mais aussi permettre la formation simultanée d'une émulsion afin d'obtenir un produit fini coloré, actif et stable en une seule étape.

Enfin, le duramen de campêche (*Haematoxylum campechianum* L.) contient un colorant polaire hydrosoluble : l'hématéine. Une extraction assistée par ultrasons à l'eau a pu être réalisée sans optimisation particulière. Toutefois, l'hématéine étant un composé peu stable, l'enjeu était de limiter sa dégradation. Plusieurs méthodes susceptibles de stabiliser la couleur, inspirées par les méthodes décrites pour d'autres colorants peu stables comme les bétalaïnes ou les anthocyanes ont donc été étudiées. Ainsi, l'acidification du solvant d'extraction, la co-pigmentation par des composés antioxydants, l'encapsulation par les cyclodextrines l'extraction par des NaDES ont été expérimentés.

## CHAPITRE I

Afin de guider le développement de la méthode d'extraction puis de caractériser les extraits optimisés de chaque plante, le dosage du colorant, la détermination de l'activité antioxydante de l'extrait optimisé de chaque plante ont été réalisés. De plus, la composition moléculaire des extraits optimisés a été effectuée UHPLC-HRMS/MS. Enfin, pour aller au bout de la démarche de l'incorporation des extraits aqueux dans un produit fini cosmétique plusieurs voies de formulation ont été envisagées pour chacun des extraits en suivant les recommandations sur les produits et les formules de Terre de Couleur. Le niveau de valorisation varie de l'utilisation de l'extrait pour colorer une formulation au développement d'une méthode d'extraction-formulation en une étape.

## Chapitre II

Extraction assistée par micro-ondes  
de colorants moyennement polaires

### I. Introduction

L'eau est solvant vert qui permet d'extraire les colorants hydrosolubles et d'incorporer directement l'extrait obtenu dans une formulation cosmétique. Cependant, les méthodes d'extraction conventionnelles à l'eau ne permettent pas d'extraire les molécules moyennement polaires ( $0 < \log P < 2$ ). Il devient alors nécessaire d'intensifier l'extraction en utilisant des méthodes innovantes.

La garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.) est une des plantes tinctoriales dont l'utilisation est la plus ancienne, remontant jusqu'à l'Égypte antique [282]. Sa racine est particulièrement riche en anthraquinones glycosylées et aglycones, qui donnent à son extrait une teinte rouge-orangée [282,283]. Les anthraquinones sont relativement stables face aux rayonnements ultraviolets et aux températures élevées, ce qui facilite leur extraction et leur utilisation comme colorant dans les domaines agroalimentaire, cosmétique ou textile [33,284].

Les méthodes d'extraction des anthraquinones les plus utilisées sont le soxhlet, le chauffage sous agitation et l'extraction assistée par ultrasons avec des solvants hydroalcooliques [282,285]. Cependant, l'utilisation d'éthanol ou de méthanol à chaud peut causer la formation d'artéfact lors de l'extraction, caractérisés respectivement par des groupements 2-éthoxyméthyle ou 2-méthoxyméthyle [282]. L'extraction des anthraquinones de la garance à l'eau a déjà été réalisée, notamment par chauffage sous agitation ou par micro-ondes, mais sans comparaison à d'autres méthodes ou solvants d'extraction [145–147,215].

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) est une technique d'extraction verte qui utilise les micro-ondes pour chauffer rapidement le milieu d'extraction [204]. La MAE en réacteur fermé permet non seulement une augmentation de la température, mais aussi une augmentation de la pression qui permet d'atteindre l'état subcritique de l'eau [204]. Dans ces conditions, la constante diélectrique de l'eau diminue et se rapproche de celle des solvants hydroalcooliques [12]. Ainsi l'extraction assistée par micro-ondes à l'eau pourrait s'avérer aussi efficace que les solvants hydroalcooliques pour l'extraction des anthraquinones de la garance.

Le développement d'une méthode d'extraction assistée par micro-ondes à l'eau des anthraquinones de la garance des teinturiers est détaillé dans ce chapitre. Un plan d'expériences en surface de réponse de type Box-Behnken a été utilisé pour optimiser la

## CHAPITRE II

puissance des micro-ondes, le nombre de cycles d'extraction et le ratio/plante eau avec le rendement d'extraction comme réponse. Les données obtenues ont ensuite été retravaillées afin de définir un extrait possédant un rendement élevé et une couleur intense. La méthode d'extraction a ensuite été comparée à diverses méthodes de référence incluant des techniques conventionnelles (soxhlet et chauffage sous agitation dans un solvant hydroalcoolique) et des méthodes plus innovantes (extraction assistée par ultrasons et extraction par liquide pressurisé à l'eau). Elle a aussi été comparée à la MAE utilisant d'autres solvants décrits comme efficaces pour l'extraction des anthraquinones : l'eau à pH basique et un mélange hydroalcoolique [282]. Les principales familles moléculaires de l'extrait ont été identifiées et ses teneurs en anthraquinones et en composés phénoliques ont été mesurées. Enfin, les principaux composés ont été identifiés par UHPLC-DAD-HRMS/MS.

## II. La garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.)

### A. Description de la plante

La garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.) est une herbacée native du pourtour méditerranéen, d'Asie Mineure et du Caucase. On la retrouve aujourd'hui à l'état sauvage en Europe et dans une grande partie de l'Amérique et de l'Asie [282]. Elle appartient à la famille des Rubiaceae (Tableau II-1), qui compte autour de 450 genres et 6500 espèces d'arbres, arbustes et herbacées.

**Tableau II-1 :** Classification de la garance des teinturiers selon la classification APG IV (classification botanique des angiospermes établie par l'Angiosperm Phylogeny Group en 2016).

|                    |                                        |
|--------------------|----------------------------------------|
| Règne              | Plantae                                |
| Sous-embranchement | Angiospermes                           |
| Classe             | Eudicotylédones                        |
| Sous-classe        | Astéridées                             |
| Ordre              | Gentianales Juss. ex Bercht. & J.Presl |
| Famille            | Rubiaceae Juss.                        |
| Genre              | <i>Rubia</i> L.                        |
| Espèces            | <i>Rubia tinctorum</i> L.              |

Parmi elles, on retrouve environ 60 espèces du genre *Rubia*, originaires d'Afrique, d'Asie et d'Amérique [282,286]. Les Rubiaceae, particulièrement les genres *Rubia*, *Galium* et *Morinda*, sont réputées pour leur richesse en anthraquinones, principalement stockées dans les racines [283].

## CHAPITRE II

La garance des teinturiers est une plante vivace pouvant mesurer 1 m, aux tiges couchées ou grimpantes, à section carrée et munies d'aiguillons. Elle possède des feuilles coriaces lancéolées verticillées et munies d'aiguillons sur la nervure principale et les bordures. Son inflorescence correspond à une cyme axillaire ou terminale portant des fleurs jaune vif. Elle laisse place fin août à des baies subglobuleuses noires. Son rhizome rampant est composé d'une fine enveloppe noire qui recouvre une couche intermédiaire rouge entourant le canal médullaire (Figure II-1) [282,287].

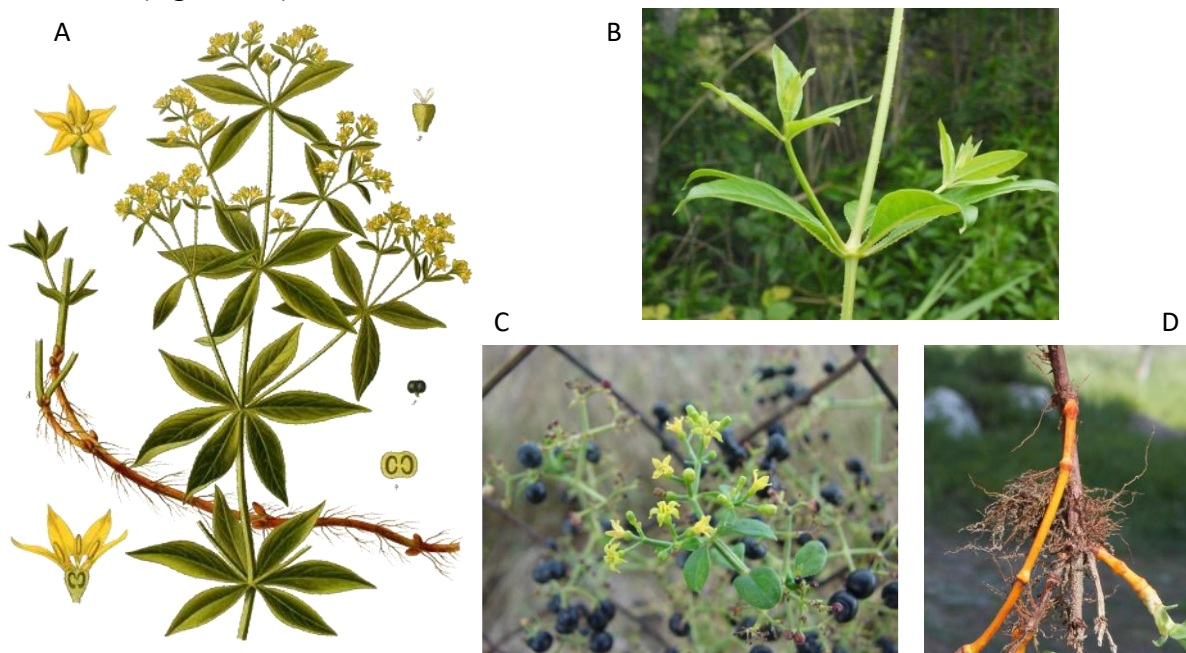


**Figure II-1 :** Représentations de la garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.). A : Illustration botanique provenant du guide des Plantes médicinales de Köhler [288], B, C et D : photographies de *Rubia tinctorum* présentes sur l'eFlore de Tela botanica [287]. Auteurs : B et D : Liliane Roubaudi, C : Paul Fabre.

### B. Composition de la racine

Le colorant de la garance des teinturiers est contenu dans ses racines. Il est principalement composé d'antraquinones. La racine de garance contient aussi d'autres composés phénoliques, notamment des acides phénoliques et des flavonoïdes [282].

#### 1. Anthraquinones

Les anthraquinones de la garance des teinturiers sont généralement substituées sur le cycle A (Figure II-2), principalement par des groupements hydroxyles, mais aussi par des groupements méthoxyles, hydroxyméthyles ou méthyles. Une quarantaine d'antraquinones ont été décrites à ce jour (Tableau II-2), les principales étant l'alizarine, la purpurine, la lucidine, la munjistine et leurs dérivés glycosylés [282,283,286].

## CHAPITRE II

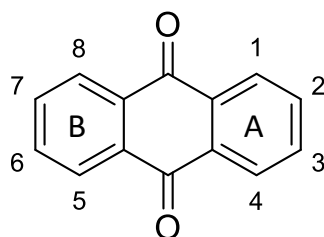


**Figure II-2 :** Structure de base des anthraquinones.

Dans la plante, les anthraquinones sont principalement stockées sous forme glycosylée [282]. Dans la majorité des cas, le sucre porté par les anthraquinones glycosylées est alors un primevérose (xylose-glucose) [283]. Les anthraquinones glycosylées peuvent être hydrolysées par des enzymes directement dans la plante, ou bien chimiquement lors du procédé d'extraction, menant à l'observation des formes génines dans les extraits [282,289].

La composition en anthraquinones de la garance des teinturiers est bien documentée et varie relativement peu en fonction des conditions de culture et des cultivars. D'ailleurs, les différentes espèces de garance peuvent être identifiées par leur composition grâce à la présence ou non de certaines anthraquinones utilisées comme marqueurs [290]. Pour la garance des teinturiers, il s'agit de l'alizarine et de son dérivé glycosylé ainsi que l'acide rubérythrique [290].

## CHAPITRE II

**Tableau II-2 :** Anthraquinones décrites dans la garance des teinturiers.

|                                             | Cycle A |                     |                  |    | Cycle B           | Formule                                        | M       | Références |
|---------------------------------------------|---------|---------------------|------------------|----|-------------------|------------------------------------------------|---------|------------|
|                                             | 1       | 2                   | 3                | 4  | 5, 6, 7, 8        | brute                                          | (g/mol) |            |
| 2-méthylantraquinone                        | H       | CH <sub>3</sub>     | H                | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> | 222,1   | [291]      |
| 2-hydroxyantraquinone                       | H       | OH                  | H                | H  | H                 | C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>  | 224,0   | [292]      |
| 2-(hydroxyméthyl)antraquinone               | H       | CH <sub>2</sub> OH  | H                | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> | 238,1   | [291]      |
| 2-méthoxyantraquinone                       | H       | OMe                 | H                | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> | 238,1   | [293]      |
| 2-hydroxy-7-méthylantraquinone              | H       | OH                  | H                | H  | 7=CH <sub>3</sub> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> | 238,1   | [291]      |
| 1-hydroxy-2-méthylantraquinone              | OH      | CH <sub>3</sub>     | H                | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> | 238,1   | [291]      |
| Danthrone                                   | OH      | H                   | H                | H  | 8=OH              | C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>  | 240,0   | [294]      |
| 2,6-dihydroxyantraquinone                   | H       | OH                  | H                | H  | 6=H               | C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>  | 240,0   | [295]      |
| Quinizarine                                 | OH      | H                   | H                | OH | H                 | C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>  | 240,0   | [294]      |
| Xanthopurpurine                             | OH      | H                   | OH               | H  | H                 | C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>  | 240,0   | [291]      |
| Alizarine                                   | OH      | OH                  | H                | H  | H                 | C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>  | 240,0   | [291,296]  |
| 2-éthoxyméthylantraquinone                  | H       | CH <sub>2</sub> OEt | H                | H  | H                 | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> | 252,1   | [293]      |
| 1-méthoxy-2-méthylantraquinone              | OMe     | CH <sub>3</sub>     | H                | H  | H                 | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> | 252,1   | [292]      |
| Digiferruginol                              | OH      | CH <sub>2</sub> OH  | H                | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> | 254,1   | [293]      |
| Rubiadine                                   | OH      | CH <sub>3</sub>     | OH               | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> | 254,1   | [291]      |
| Xanthopurpurin 3-méthyléther                | OH      | H                   | OCH <sub>3</sub> | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> | 254,1   | [282]      |
| Xanthopurpurine 1-méthyléther               | OMe     | H                   | OH               | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> | 254,1   | [282]      |
| Alizarine 1-méthyléther                     | OMe     | OH                  | H                | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> | 254,1   | [292]      |
| Alizarine 2-méthyléther                     | OH      | OMe                 | H                | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> | 254,1   | [292]      |
| Anthragallol                                | OH      | OH                  | OH               | H  | H                 | C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>  | 256,0   | [292]      |
| Purpurine                                   | OH      | CHO                 | OH               | H  | H                 | C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>  | 256,0   | [294,296]  |
| Nordamnacanthol                             | OH      | CHO                 | OH               | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>  | 268,0   | [291]      |
| Xanthopurpurine diméthyléther               | OMe     | H                   | OMe              | H  | H                 | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> | 268,1   | [282]      |
| Alizarine diméthyléther                     | OMe     | OMe                 | H                | H  | H                 | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> | 268,1   | [292]      |
| Anthragallol 3-méthyléther                  | OH      | OH                  | OMe              | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> | 270,1   | [292]      |
| 1,4-Dihydroxy-2-hydroxyméthyl anthraquinone | OH      | CH <sub>2</sub> OH  | H                | OH | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> | 270,1   | [293]      |
| Lucidine                                    | OH      | CH <sub>2</sub> OH  | OH               | H  | H                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> | 270,1   | [296]      |

## CHAPITRE II

|                                |    |                     |        |        |   |                                                 |       |               |
|--------------------------------|----|---------------------|--------|--------|---|-------------------------------------------------|-------|---------------|
| Munjistine                     | OH | COOH                | OH     | H      | H | C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>   | 284,0 | [294]         |
| Lucidine $\omega$ -méthyléther | OH | CH <sub>2</sub> OMe | OH     | H      | H | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 284,1 | [291]         |
| Anthragallol 2,3-diméthyléther | OH | OMe                 | OMe    | H      | H | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 284,3 | [292]         |
| Munjistine méthylester         | OH | COOMe               | OH     | H      | H | C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | 298,0 | [291]         |
| Christofine                    | OH | CH <sub>2</sub> OEt | H      | OH     | H | C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>  | 298,1 | [293]         |
| Lucidine $\omega$ -éthyléther  | OH | CH <sub>2</sub> OEt | OH     | H      | H | C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>  | 298,1 | [291]         |
| Pseudopurpurine                | OH | COOH                | OH     | OH     | H | C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>   | 300,0 | [292]         |
| Alizarine glucoside            | OH | O-glc               | H      | H      | H | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>  | 402,4 | [294]         |
| Rubianine                      | OH | C-glc               | OH     | H      | H | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>  | 402,4 | [297]         |
| Lucidine 3-O-glucoside         | OH | CH <sub>2</sub> OH  | O-glc  | H      | H | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 432,1 | [294]         |
| Acide rubérythrique            | OH | O-prim              | H      | H      | H | C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub> | 534,1 | [291,294,296] |
| Rubiadine primevéroside        | OH | CH <sub>3</sub>     | O-prim | H      | H | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub> | 548,2 | [296]         |
| Lucidine primevéroside         | OH | CH <sub>2</sub> OH  | O-prim | H      | H | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub> | 564,1 | [296]         |
| Galiosine                      | OH | COOH                | OH     | O-prim | H | C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>16</sub> | 594,1 | [296]         |

Me : méthyle, Et : éthyle, glc : glucose, prim : primevérose

## CHAPITRE II

### 2. Flavonoïdes et acides cinnamiques

Parmi les autres métabolites spécialisés décrits dans la garance, on retrouve principalement des flavonoïdes et des acides cinnamiques (Tableau II-3).

**Tableau II-3 : Flavonoïdes et acides cinnamiques décrits dans la garance des teinturiers.**

| Molécules                                         | Formule brute                                   | M (g/mol) | Références |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|------------|
| <b>Flavonoïdes</b>                                |                                                 |           |            |
| Acacétine                                         | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 284,1     | [293]      |
| Acacétine 7-rutinoside                            | C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub> | 592,2     | [293]      |
| Apigénine                                         | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | 270,1     | [293]      |
| Baicaléine 7-O-glucuronide                        | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub> | 446,1     | [293]      |
| Catéchine                                         | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>  | 290,3     | [298]      |
| Epicatéchine                                      | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>  | 290,3     | [298]      |
| Hespérétine                                       | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>  | 302,1     | [293]      |
| Hespérétine-7-O-néohespéridoside (néohespéridine) | C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub> | 610,2     | [293]      |
| Isorhamnétine 3-O-glucoside                       | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> | 478,1     | [293]      |
| Kaempférol 3-O-rhamnoside (afzéline)              | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 432,1     | [293]      |
| Kaempférol 7-O-neohespéridoside                   | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub> | 594,2     | [293]      |
| Lutéoline                                         | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | 286,0     | [293]      |
| Lutéoline 4'-7-O-diglucoside                      | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 610,2     | [293]      |
| Lutéoline 7-O-glucoside                           | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 448,1     | [293]      |
| Naringénine                                       | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 272,1     | [293]      |
| Naringénine 7-O-glucoside (prunine)               | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> | 434,1     | [293]      |
| Quercétine 3-O-galactoside (hypéroside)           | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 464,1     | [299]      |
| Quercétine 3-O-rhamnoside (quercitrine)           | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 448,1     | [293]      |
| Quercétine 3-O-rutinoside (rutine)                | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 610,2     | [282]      |
| Quercétine 3-O-xyloside                           | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub> | 434,1     | [293]      |
| <b>Acides cinnamiques</b>                         |                                                 |           |            |
| Acide chlorogénique                               | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>  | 354,1     | [299]      |
| Acide rosmarinique                                | C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>  | 360,3     | [300]      |
| Eicosyle férulate                                 | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>  | 474,4     | [291]      |
| Hexadécyle férulate                               | C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>  | 418,3     | [291]      |
| Octadécyle férulate                               | C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>  | 446,3     | [291]      |

Plusieurs dérivés glycosylés de la quercétine et du kaempférol, ainsi que plusieurs flavanones et flavones ont ainsi été décrits dans la garance des teinturiers (Tableau II-3) [293,298]. Les acides cinnamiques précédemment décrits dans la garance des teinturiers sont l'acide chlorogénique, l'acide rosmarinique, et plusieurs alkyles férulates [291,298–300].

### 3. Autres

Parmi les autres composés identifiés dans la garance des teinturiers, on retrouve plusieurs acides carboxyliques (acides malique, citrique, quinique) [298,300] et trois iridoïdes

## CHAPITRE II

(aspéruloside et ses dérivés) [301,302], ainsi que la néohesperidine dihydrochalcone [293], la mollugine [291,303], le lapachol méthyléther [291] et la scopolétine [291] (Figure II-3).

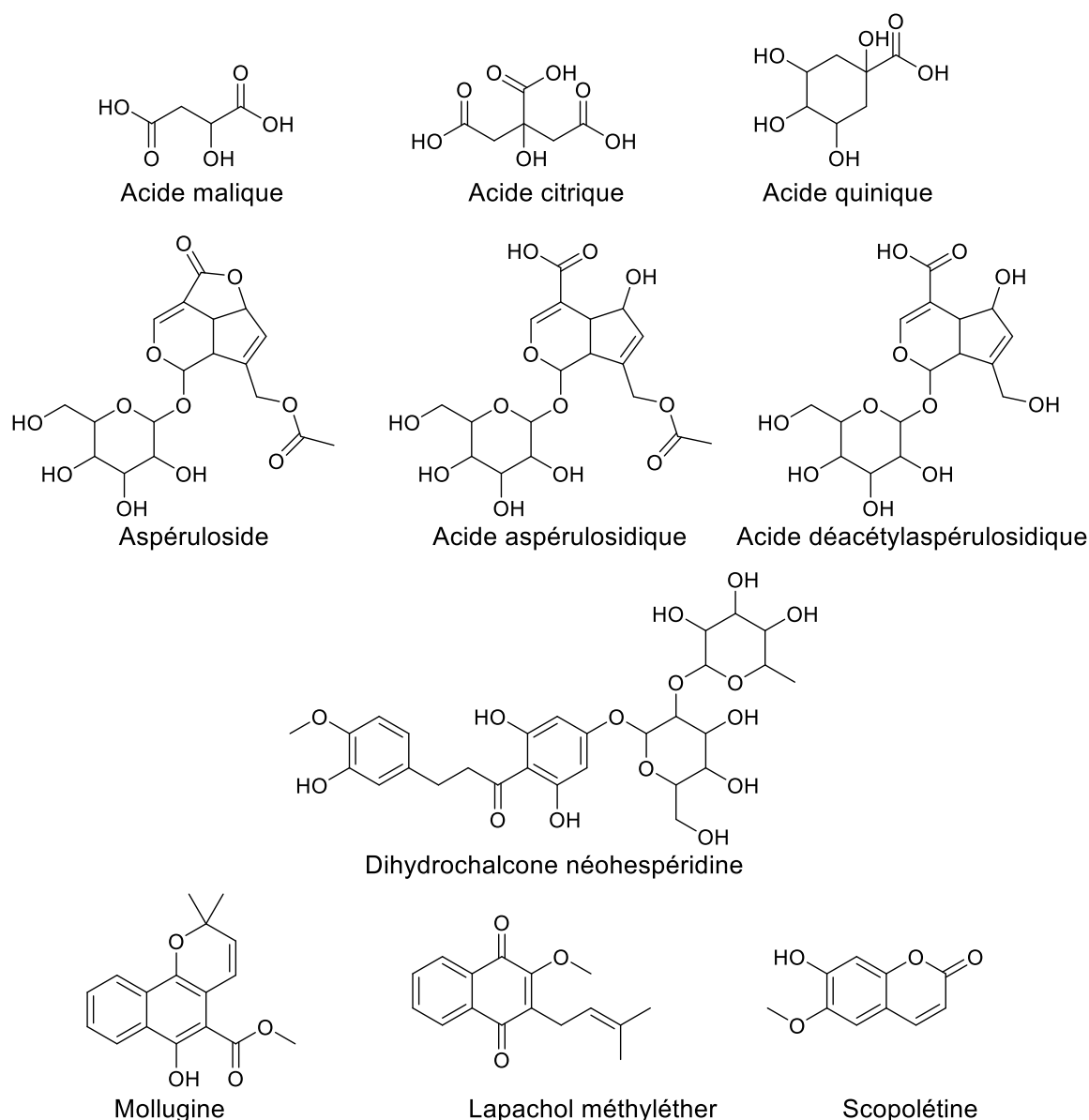


**Figure II-3 :** Structure des autres composés décrits dans la garance des teinturiers.

### C. Histoire du colorant issu de *Rubia tinctorum*

La garance des teinturiers est l'une des principales plantes tinctoriales de la famille des Rubiaceae. Son nom provient du latin et réfère directement à ses capacités tinctoriales le mot *rubia* correspondant à sa couleur rouge et *tinctorum* à son utilisation pour la teinture [282]. Les principales couleurs pour lesquelles elle a été utilisée sont le rouge, le rose, le violet, le brun et le noir. Ces teintes peuvent être obtenues par complexation avec différents métaux [283].

## CHAPITRE II

La plus ancienne trace de son utilisation est un carquois égyptien datant de 4000 ans avant notre ère. D'autres objets teints avec de la garance ont aussi été retrouvés dans la tombe de Toutankhamon (1350 avant notre ère) [282,286]. L'usage de la garance a perduré à travers les époques et dans différentes régions du monde. Des traces de son utilisation ont notamment été retrouvées en Inde, en Chine et autour de la mer Morte et c'était l'un des principaux colorants employés en Grèce antique et dans l'Empire romain [282,283,286]. La garance était alors principalement utilisée pour la teinture textile, mais aussi comme colorant alimentaire et cosmétique [286]. Des poudres cosmétiques roses à base de garance ont notamment été retrouvées sur des sites puniques (IV<sup>e</sup>-I<sup>er</sup> siècles avant notre ère) et romains (I<sup>er</sup>-V<sup>e</sup> siècles apr. J.C.) [50,304,305]. Au Moyen-Age, Charlemagne a inclus la garance dans son Capitulaire de Villis, dans lequel il ordonne la culture d'une liste de plantes incluant des plantes tinctoriales [282]. La garance est longtemps restée cultivée en France et a tenu une grande importance économique grâce à ses vertus tinctoriales jusqu'au XIX<sup>e</sup> siècle. En 1869, Graebe et Liebermann découvrent une voie de synthèse de l'alizarine. Celle-ci va alors rapidement remplacer l'extrait de garance car elle est moins chère à produire, causant le déclin de la culture de la garance [282,283,286].

Aujourd'hui, la garance des teinturiers et son extrait sont encore utilisés comme teinture textile [306,307] et comme ingrédient cosmétique en tant qu'agent d'entretien de la peau, tonifiant ou agent apaisant [60]. On les retrouve dans des produits de soin et d'hygiène pour la peau et les cheveux, des produits de maquillage et des colorations capillaires naturelles. De plus, l'alizarine est un colorant cosmétique autorisé en Europe d'après l'Annexe IV du règlement CE n°1223/2009 [59].

### **D. Extraction des anthraquinones de la garance**

#### **1. Extraction par des solvants organiques**

Les solvants décrits pour l'extraction conventionnelle des anthraquinones dépendent de la forme ciblée. Des solvants apolaires (éther, benzène, chloroforme, dichlorométhane ou acétate d'éthyle) sont décrits pour les génines, tandis que des solvants polaires (eau, éthanol, méthanol ou mélanges hydroalcooliques) sont préférés pour les anthraquinones glycosylées [282]. Cependant, l'extraction à chaud par le méthanol ou l'éthanol peut causer la formation d'anthraquinones altérées par des groupements 2-méthoxyméthyle ou 2-éthoxyméthyle respectivement [282,283,289]. Des solutions basiques (carbonate, bicarbonate ou hydroxyde

## CHAPITRE II

de sodium) ont aussi été décrites pour l'extraction conventionnelle des anthraquinones, celles-ci étant sous leur forme ionisée et donc plus solubles en solution aqueuse à pH basique [171,282,308].

Dulo *et al.* ont prédit la solubilité des anthraquinones dans différents solvants et déterminé que les solvants les plus adaptés pour l'extraction des anthraquinones non glycosylées sont les mélanges hydroalcooliques contenant de l'éthanol ou du méthanol dans différentes proportions en fonction des composés cibles. Pour les anthraquinones glycosylées, l'eau est le solvant qui obtient les meilleurs résultats dans cette prédiction [285]. Plusieurs solvants hydroalcooliques ont en effet été décrits dans la littérature pour l'extraction des anthraquinones de la garance. Derksen *et al.* ont comparé plusieurs solvants tels que l'éthanol, le méthanol, l'eau et l'hydroxyde de sodium aqueux et ont effectivement déterminé que le solvant le plus efficace était un mélange éthanol/eau (50/50) [309]. Ce solvant a été utilisé avec succès pour extraire les anthraquinones glycosylées et libres de la racine de *Rubia tinctorum* par reflux [294,309,310].

Dabiri *et al.* ont développé une méthode d'extraction par MAE de l'alizarine et de la purpurine [311]. Ils ont comparé l'efficacité de l'éthanol 50%, du méthanol 50% et de ces deux solvants purs et déterminé que le méthanol permettait une meilleure extraction des deux anthraquinones cibles que l'éthanol. En effet, le méthanol possède une constante diélectrique plus élevée que l'éthanol, ce qui lui permet une meilleure absorption des micro-ondes et donc une hausse de température plus rapide et plus forte [311]. Une optimisation par plan d'expériences leur a ensuite permis d'ajuster la proportion de méthanol à 30%, correspondant à un solvant plus polaire, qui est plus propice à l'extraction des hydroxyanthraquinones. Leurs conditions d'extraction optimales sont 0,5 g de garance/20 mL, 30% de méthanol dans l'eau, 20 min d'extraction à 600 W appliqués par pulses. Cette méthode leur a permis d'obtenir un taux de récupération relatif de 140% par rapport au reflux (éthanol 25%, 6 h), tout en divisant le temps d'extraction par 18 et en pouvant traiter 14 échantillons à la fois [311]. Plusieurs extractions assistées par ultrasons ont aussi été décrites avec un solvant méthanol 37% (25 kHz, 20 g/500 mL, 18 min, 36°C) [296,312] ou 40% (0,5 g/20 mL, 2 h, température ambiante) [311].

Les méthodes les plus employées dans la littérature pour l'extraction des anthraquinones de la garance sont le reflux [294,309–311], le soxhlet [146,292,313] et l'extraction sous agitation

[145,147,171,308,314]. Parmi les méthodes pouvant être considérées comme de l'éco-extraction, l'extraction assistée par ultrasons [296,307,311,312] et l'extraction assistée par micro-ondes [215,311] ont été décrites.

### 2. Extraction à l'eau

Plusieurs extractions à l'eau seule ont été décrites, principalement pour une application en teinture textile [145–147,215]. Ces méthodes permettent l'extraction des anthraquinones glycosylées, mais aussi des génines par chauffage sous agitation (60-90 min, 100°C) [145–147], soxhlet ou extraction assistée par micro-ondes (100 W, 90°C, 5 min) [215]. Cependant, dans ces travaux, aucune comparaison à une autre méthode d'extraction ou à un autre solvant n'est réalisée. Il n'est donc pas possible de conclure sur la réelle efficacité de l'extraction à l'eau. En effet, De Santis *et al.* ont montré que le méthanol est plus efficace que l'eau pour l'extraction de l'alizarine par macération (0,5 g/20 mL, 12 h, 25°C) [314].

Curieusement, l'extraction à l'eau subcritique, décrite pour plusieurs autres sources d'anthraquinones comme *Morinda citrifolia* [226,227,315,316], *Heterophyllaea pustulata* [216,228], *Rheum tanguticum* [317] ou *Reynoutria multiflora* [318], n'a pas été retrouvée dans la littérature pour l'extraction de la garance des teinturiers. D'après les extractions réalisées sur les autres plantes sources, l'extraction à l'eau subcritique est plus efficace que les diverses références hydroalcooliques [216,226,316,317]. De plus, la pression semble avoir peu d'impact sur l'efficacité de l'extraction au-delà de son rôle pour maintenir l'eau à l'état liquide [227,317]. Enfin, l'alizarine (présente dans les racines de *Morinda citrifolia*) n'est pas sensible à la température jusqu'à 220°C [227] et sa concentration dans l'extrait augmente avec la température d'extraction [227,316].

### 3. Conclusion et choix de la méthode d'extraction

D'après la revue de littérature, l'extraction des anthraquinones dans l'eau est possible en utilisant une méthode d'extraction adaptée. Pour la garance des teinturiers, les méthodes d'extraction à l'eau décrites n'ont pas été comparées à des méthodes de référence. Il y a donc un réel intérêt à développer une méthode d'éco-extraction à l'eau et à la confronter à différentes méthodes et solvants d'extraction plus couramment décrits.

D'après la littérature, les solvants hydroalcooliques sont les plus efficaces pour extraire l'ensemble des anthraquinones de la garance. L'augmentation de la température et de la pression permettent de diminuer la constante diélectrique de l'eau afin d'approcher la

polarité des solvants hydroalcooliques. En effet, la constante diélectrique de l'eau subcritique à 250°C et 50 bars (5 MPa) est de 27, soit un intermédiaire entre l'éthanol et le méthanol, respectivement à 24 et 33 [94]. L'état subcritique peut être atteint par l'extraction par liquide pressurisé, mais aussi par l'extraction assistée par micro-ondes dans un réacteur fermé. Cette dernière a été choisie car elle est moins coûteuse en temps et en énergie, puisque l'élévation de température est très rapide (de l'ordre de quelques secondes) et parce qu'elle est plus facilement transposable au niveau industriel.

### III. Optimisation de l'extraction à l'eau de la racine de garance

#### A. Optimisation par plan d'expériences de l'extraction assistée par micro-ondes

##### 1. Choix des facteurs et niveaux

L'appareillage utilisé pour l'extraction micro-ondes (Annexe 2) dispose d'un réglage de puissance entre 0 et 1000 W et d'un suivi de la température interne du réacteur. Les limites de température et de pression du réacteur sont de 180°C et 15 bars. La puissance et le temps d'extraction ont été choisis comme facteurs d'extraction. Ces deux facteurs influençant fortement la température, celle-ci n'a pas été choisie comme facteur, mais elle a été suivie afin de contrôler la variabilité des conditions d'extraction.

Le réacteur d'extraction a un volume de 50 mL et peut contenir entre 12 et 30 mL de solvant. Le ratio plante/solvant est un facteur qui peut influencer le rendement d'extraction, notamment par son influence sur la surface d'échange entre la plante et le solvant. Le ratio plante/eau a donc été choisi comme facteur et représenté par la masse de plante introduite dans un volume de 20 mL.

L'échantillon de garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.) étudié nous a été fourni par notre partenaire industriel (Annexe 1), qui l'utilise déjà dans certains de ses produits cosmétiques. La garance des teinturiers a été fournie sous forme de poudre fine et a donc été utilisée directement sous cette forme et l'influence de la granulométrie n'a pas été étudiée.

Des essais préliminaires ont été réalisés afin de déterminer les seuils de ratio, puissance et de temps pouvant être utilisés sans causer une surchauffe et une décompression du réacteur. Pour le ratio plante/eau, un niveau maximum à 1 g/20 mL a été choisi en raison de la faible

## CHAPITRE II

mouillabilité de la poudre de plante. En effet, une plus grande quantité de plante ne pouvait pas se disperser de manière homogène, ce qui aurait pu augmenter la variabilité du procédé d'extraction. Une extraction préliminaire a été réalisée avec 100 mg de poudre de plante pour 20 mL à 1000 W pendant 30s. À la suite de ce traitement, la température du réacteur était proche de 150°C.

L'extraction à la puissance maximale est donc possible si la durée d'extraction ne dépasse pas 30 secondes. Ces conditions de durée et de puissance seront donc utilisées comme conditions maximales. Afin de moduler la durée d'extraction tout en évitant une surchauffe, plusieurs cycles de 30 secondes seront réalisés en ramenant le réacteur à température ambiante entre chaque cycle. Pour suivre la cinétique d'extraction des composés d'intérêt, 5 cycles successifs d'extraction ont été réalisés (en refroidissant le réacteur dans l'eau glacée entre chaque cycle) et un petit volume (200  $\mu$ L) de l'extrait a été prélevé et injecté en HPLC (Annexe 6). La figure II-4 montre l'évolution du profil chromatographique de l'extrait en fonction du nombre de cycles d'extraction.

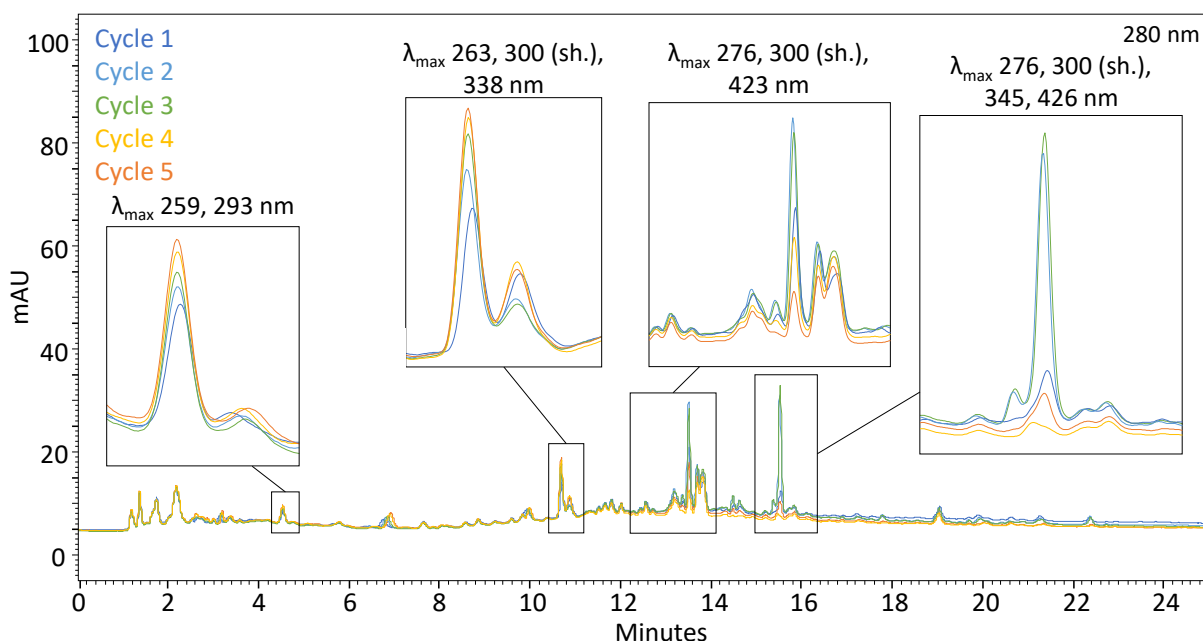


**Figure II-4 :** Superposition des chromatogrammes UV (280 nm) obtenus après chacun des 5 cycles d'extraction (1000 W, 100 mg/mL eau, cycles de 30 s).

Les pics majoritaires détectés à 13,54 min et 15,56 min ont un spectre d'absorbance qui correspond à celui des anthraquinones avec notamment une bande d'absorption à 420 nm (Figure II-4) [283]. La hauteur de ces pics augmente jusqu'au deuxième cycle d'extraction. Elle n'évolue plus après le 3<sup>e</sup> cycle et diminue après le 4<sup>e</sup> cycle. Cependant, la hauteur des pics plus

## CHAPITRE II

polaires élués à 4,54 min et 10,78 min augmente tout au long de l'extraction. D'après leur spectre d'absorption, ces derniers ne sont pas des anthraquinones, ce qui indique que la multiplication de cycles pourrait favoriser l'extraction d'autres types de composés.

Le spectre d'absorbance de l'extrait MAE à l'eau comporte une large bande d'absorbance dans le visible entre 400 et 550 nm, correspondant probablement à la superposition des bandes d'absorbance caractéristiques des anthraquinones à 420 et 500 nm (Figure II-5) [283].

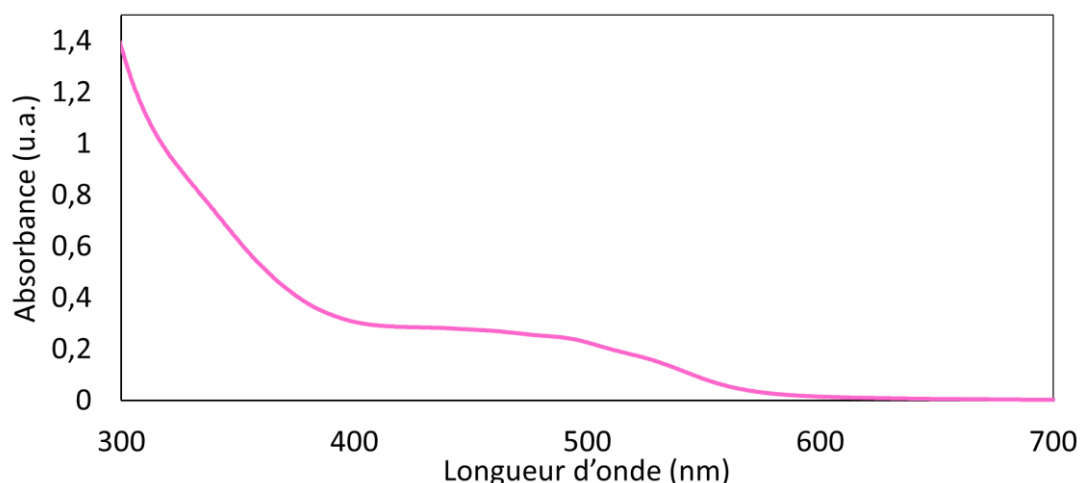


**Figure II-5** : Spectre d'absorption (300-700 nm) de l'extrait de garance obtenu par MAE à l'eau.

Ainsi pour optimiser l'extraction assistée par micro-ondes dans l'eau, les facteurs sélectionnés et leurs niveaux correspondants sont le nombre de cycles (1-5 cycles de 30 s), la puissance des micro-ondes (200-1000 W) et le ratio plante/eau (100-1000 mg/20 mL). La réponse utilisée lors du plan d'expériences est le rendement d'extraction (%). Celui-ci a été calculé comme le ratio entre la masse d'extrait sec obtenu et la masse de plante extraite. Il permet de mesurer l'efficacité globale de l'extraction, tandis que la couleur des extraits a été utilisée dans un second temps pour évaluer l'efficacité de l'extraction des anthraquinones. Pour cela, la longueur d'onde 500 nm a été choisie car elle est plus spécifique que 420 nm.

### 2. Réalisation du plan d'expériences

Un plan d'expériences en surface de réponse de type Box-Behnken a été utilisé pour optimiser l'extraction assistée par micro-ondes. Ce type de plan d'expériences permet de réaliser l'optimisation en un nombre minimal d'essais par rapport au plan composite centré ou au plan factoriel complet à 3 niveaux [319].

Le plan d'expériences a permis d'étudier l'impact du nombre de cycles ( $X_1$ , 1-5), de la puissance des micro-ondes ( $X_2$ , 200-1000 W) et du ratio plante/eau ( $X_3$ , 100-1000 mg/20 mL)

## CHAPITRE II

sur le rendement d'extraction en 17 extraits incluant 4 points centraux (3 cycles, 600 W, 550 mg/20 mL). La matrice du plan d'expériences a été construite et randomisée par le logiciel Ellistat version 6.4.

Le rendement d'extraction des extraits obtenus varie entre 12,3% et 22,9%. Les points centraux ont un rendement moyen de  $15,3 \pm 0,1\%$ , ce qui montre une bonne répétabilité d'extraction. Un modèle quadratique a été ajusté afin de déterminer la relation entre les facteurs et leurs interactions et la réponse (Equation II-1). Le coefficient de régression du modèle ( $R^2$ ) de 98,3%, ajusté à 96,1% valide la corrélation entre les prédictions du modèle et les résultats expérimentaux.

$$\begin{aligned} \text{Rendement} = & 0,1612 - 0,01685 \times X_1 - 7,43\text{E-}05 \times X_2 + 3,466\text{E-}05 \times X_3 + 0,003563 \times \\ & X_1X_1 + 1,249\text{E-}07 \times X_2X_2 - 5,589\text{E-}08 \times X_3X_3 - 5,618\text{E-}07 \times X_1X_2 - 2,174\text{E-}06 \times X_1X_3 + \\ & 3,219\text{E-}08 \times X_2X_3 \end{aligned} \quad (\text{II-1})$$

L'analyse de variance montre que la régression est significative ( $p = 0,0000$ ), ce qui permet de valider le modèle quadratique (Tableau II-4). Le nombre de cycles ( $X_1$ ) est le seul paramètre qui affecte significativement ( $p\text{-value} < 0,05$ ) le rendement d'extraction. La puissance des micro-ondes ( $X_2$ ) est à la limite de la significativité, tandis que le ratio plante/solvant ( $X_3$ ) n'est pas significatif mais leur interaction ( $X_2X_3$ ) l'est. Enfin, les termes quadratiques  $X_1X_1$ ,  $X_2X_2$  et  $X_3X_3$  sont aussi significatifs (Tableau II-4).

**Tableau II-4 : Analyse de variance (ANOVA) du modèle quadratique.**

| Terme                      | Somme des carrés | Degrés de liberté | Moyenne quadratique | Valeur F | Valeur $p$ | Significatif* |
|----------------------------|------------------|-------------------|---------------------|----------|------------|---------------|
| Régression                 | 0,0170           | 9                 | 1,89E-03            | 45,1054  | 0,0000     | Oui           |
| Nombre de cycles ( $X_1$ ) | 0,0003           | 1                 | 2,86E-04            | 6,8016   | 0,0350     | Oui           |
| Puissance ( $X_2$ )        | 0,0136           | 1                 | 2,22E-04            | 5,2905   | 0,0550     |               |
| Ratio plante/eau ( $X_3$ ) | 0,0004           | 1                 | 8,30E-05            | 1,9776   | 0,2025     |               |
| $X_1X_1$                   | 0,0012           | 1                 | 5,16E-04            | 12,2858  | 0,0099     | Oui           |
| $X_2X_2$                   | 0,0010           | 1                 | 1,01E-03            | 24,1367  | 0,0017     | Oui           |
| $X_3X_3$                   | 0,0003           | 1                 | 3,25E-04            | 7,7453   | 0,0272     | Oui           |
| $X_1X_2$                   | 0,0000           | 1                 | 1,47E-06            | 0,0351   | 0,8567     |               |
| $X_1X_3$                   | 0,0001           | 1                 | 2,79E-05            | 0,6654   | 0,4415     |               |
| $X_2X_3$                   | 0,0002           | 1                 | 2,45E-04            | 5,8341   | 0,0464     | Oui           |
| Résidus                    | 0,0003           | 7                 | 4,20E-05            |          |            |               |
| Total                      | 0,0173           | 16                |                     |          |            |               |

\* Le facteur est significatif si  $p < 0,05$

Les diagrammes de surface représentant l'effet des facteurs sur le rendement d'extraction montrent que l'optimum d'extraction correspond à une puissance élevée, un ratio médian et 5 cycles d'extraction (Figure II-6). La prédiction du modèle permet d'affiner ces conclusions et

## CHAPITRE II

de déterminer que les conditions optimales d'extraction sont 5 cycles à 1000 W avec 496 mg de garance pour 20 mL d'eau et qu'elles permettent d'obtenir un rendement d'extraction de 22,8%. Ces conditions se rapprochent du point 16 du plan d'expériences (5 cycles, 1000 W, 550 mg/20 mL), pour lequel un rendement expérimental de 22,9% a été obtenu.

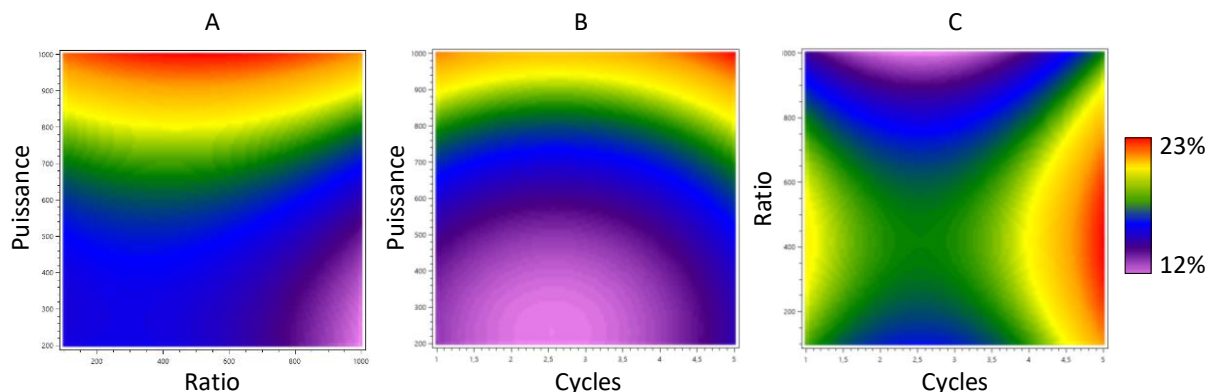


**Figure II-6 :** Diagrammes de surface représentant l'effet des interactions entre les trois facteurs étudiés sur le rendement. A : Puissance et ratio plante/eau, le nombre de cycles étant fixé à 5. B : Nombre de cycles et puissance, le ratio étant fixé à 550 mg/20 mL. C : Nombres de cycles et ratio plante/eau, la puissance étant fixée à 600 W.

La multiplication de cycles courts ( $5 \times 30$  s) permet d'intensifier l'extraction tout en limitant l'augmentation de température afin d'éviter la dégradation des composés [204]. La puissance des micro-ondes est elle aussi liée à la température du milieu d'extraction, un paramètre déjà identifié dans la littérature comme ayant un impact positif sur l'extraction des anthraquinones [311,320]. En effet, la température moyenne mesurée lors des cycles d'extraction est de  $60 \pm 11^\circ\text{C}$  à 200 W,  $97 \pm 9^\circ\text{C}$  à 600 W et  $143 \pm 16^\circ\text{C}$  à 1000 W. Enfin, l'augmentation du ratio plante/solvant permet d'augmenter le rendement d'extraction jusqu'à un point d'inflexion à partir duquel l'absorption des micro-ondes peut être perturbée, la surface de contact entre la plante et le solvant peut diminuer et le solvant peut commencer à saturer [204].

Le rendement d'extraction est une réponse importante à optimiser afin d'augmenter la quantité d'extraits obtenus, mais il tient compte de l'ensemble des familles moléculaires extraites. Or, pour évaluer l'extraction des anthraquinones, la couleur de l'extraits est une réponse plus spécifique. La couleur des extraits obtenus lors du plan d'expériences varie du jaune pâle à l'orange vif et n'est pas corrélée au rendement d'extraction. Ainsi, une seconde étape de traitement des résultats a été réalisée afin de déterminer les conditions d'extraction

## CHAPITRE II

permettant d'obtenir un extrait possédant à la fois un rendement élevé et une couleur intense.

### B. Optimisation de la couleur

Afin de comparer la couleur des extraits repris en solution aqueuse à 0,5 mg/mL, leur absorbance à 500 nm (une des longueurs d'ondes caractéristiques des anthraquinones) a été mesurée. Un diagramme de répartition a été réalisé à partir du rendement et de l'absorbance à 500 nm des extraits du plan d'expériences (Figure II-7).

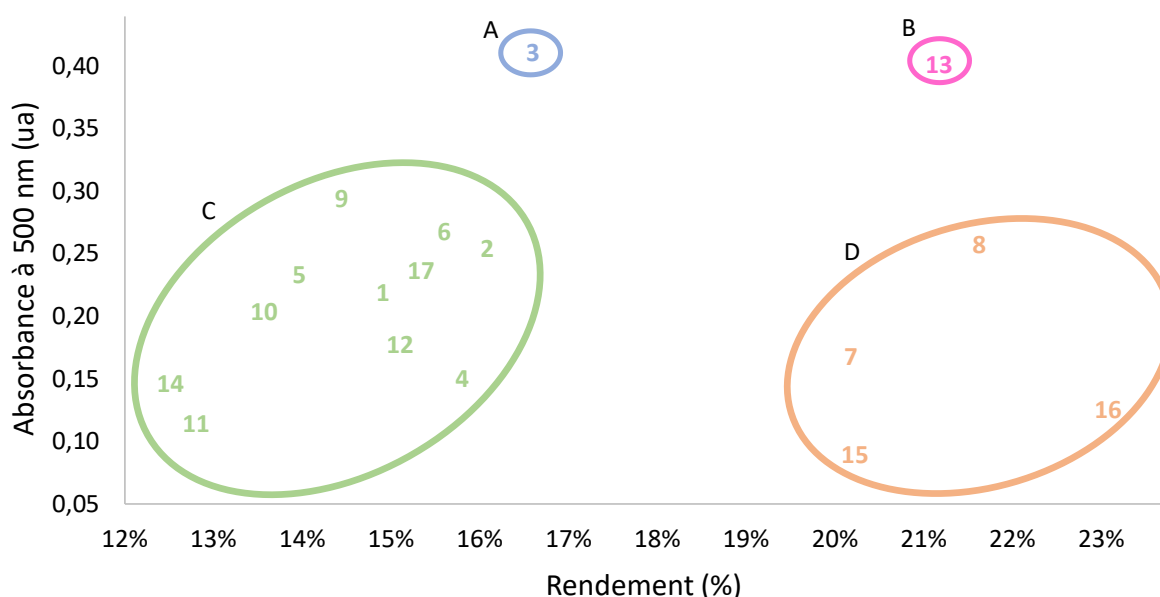


**Figure II-7 :** Diagramme de répartition des extraits du plan d'expériences en fonction de leur rendement d'extraction et de leur absorbance à 500 nm.

L'absence d'alignement des points confirme la non-corrélation entre le rendement et la couleur des extraits. De plus, 4 groupes ont été mis en avant par le nuage de point. La plupart des extraits a un rendement inférieur à 17% et une absorbance à 500 nm inférieure à 0,30 u.a. (Figure II-7, C). Seuls deux extraits ont une absorbance à 500 nm supérieure à cette valeur, l'extrait 3 (Figure II-7, A) et l'extrait 13 (Figure II-7, B). Cinq extraits ont un rendement supérieur à 20% (Figure II-7, B et D). Ces derniers ont tous été obtenus avec une puissance de micro-ondes de 1000 W, ce qui montre l'importance de ce paramètre pour l'intensification de l'extraction malgré la significativité limitée du facteur puissance dans le plan d'expériences.

L'extrait 16, point optimal déterminé par le plan d'expériences pour la réponse rendement d'extraction, possède effectivement le rendement le plus élevé (22,9%), mais il fait partie des extraits les moins colorés avec une absorbance à 500 nm de 0,126 u.a. (Figure II-7). L'extrait

## CHAPITRE II

13 est le seul extrait ayant à la fois un rendement élevé (21,0%) et une forte absorbance à 500 nm (0,402 u.a.) (Figure II-7).

L'extrait 13 a été obtenu en 1 cycle de 30 s, à une puissance de 1000 W, avec 100 mg de garance pour 20 mL d'eau. L'extrait 3, dont la couleur est intense, mais le rendement d'extraction est moyen, a été obtenu en 5 cycles, avec une puissance de 200 W et le même ratio plante/eau. D'après ces résultats, la puissance élevée a permis d'intensifier l'extraction globale, permettant d'obtenir un rendement d'extraction élevé et une couleur intense en un seul cycle, tandis que la faible puissance utilisée pour l'extrait 3 semble permettre une extraction plus spécifique des molécules colorantes. Les deux extraits ont été obtenus avec un ratio plante/eau faible, ce qui permet d'augmenter la surface d'échange entre la plante et le solvant et donc d'améliorer l'efficacité d'extraction [204]. Les seuls extraits dont le rendement est plus élevé que l'extrait 13 sont les extraits 8 et 16. Cependant, leur absorbance est bien plus faible. Les trois extraits ont été obtenus avec une puissance de 1000 W, mais 5 cycles d'extraction ont été utilisés pour les extraits 8 et 16. Il semble que le temps d'extraction plus long ait permis d'intensifier l'extraction de composés non colorés, tout en causant potentiellement la dégradation des anthraquinones ou en limitant leur extraction à cause de la saturation du solvant en composés plus polaires.

### C. Validation de l'extrait optimal

Les extraits 13 et 16 ont été répétés 3 fois afin de valider les résultats précédents (Figure II-8). Après répétition, le rendement moyen des extraits 13 et 16 est similaire ( $21,5 \pm 0,5\%$  et  $20,7 \pm 0,4\%$  respectivement), tandis que l'extrait 13 possède une absorbance près de deux fois supérieure à 500 nm. Ces résultats confirment la reproductibilité du procédé d'extraction et valident le choix de l'extrait 13 (1x30 s, 1000 W, 100 mg/20 mL) comme extrait optimal.

## CHAPITRE II

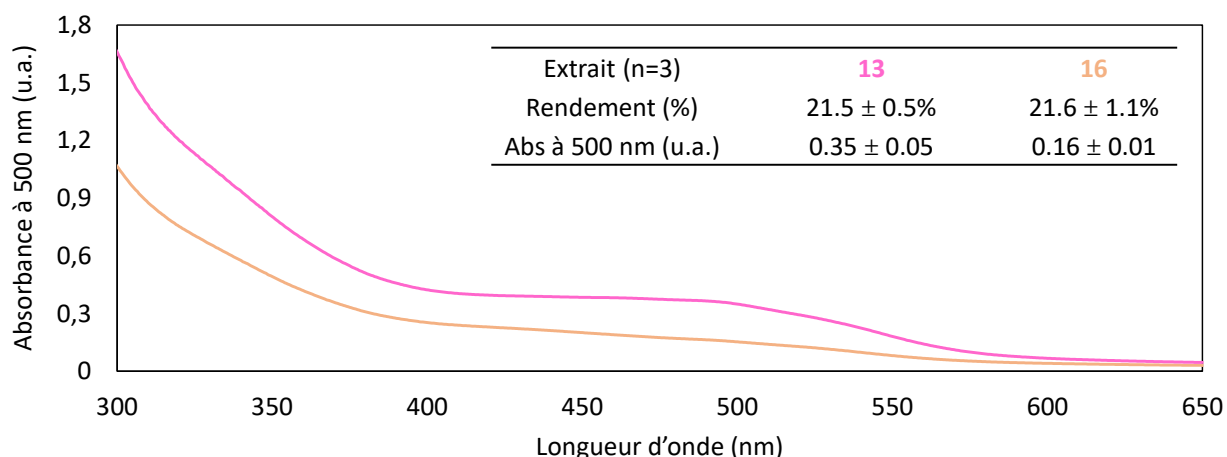


**Figure II-8:** Spectre d'absorbance des extraits 13 (rose) et 16 (orange) et tableau représentant la moyenne des rendements et l'absorbance à 500 nm de leurs 3 réplicats.

L'extrait 13 a été obtenu avec une puissance de 1000 W, correspondant à une température d'environ 140°C. A cette température et dans les conditions de pression du réacteur micro-ondes, l'eau est dans l'état subcritique (Figure II-9).

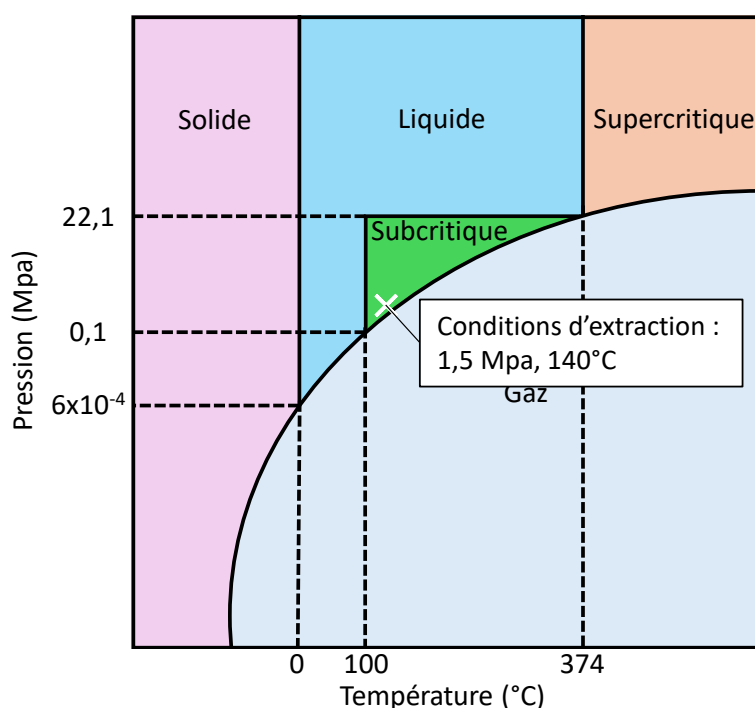


**Figure II-9 :** Schéma du diagramme de l'eau adapté de Zhang *et al.* [221] et représentation des conditions d'extraction décrites dans ce chapitre.

A l'état subcritique, la constante diélectrique de l'eau est diminuée et se rapproche de celle des solvants hydroalcooliques, ce qui peut expliquer l'efficacité de ces conditions d'extraction. De plus, en n'effectuant qu'un seul cycle, l'extraction d'autres composés est limitée au profit des anthraquinones.

### IV. Comparaison de l'extrait optimal à des extraits de référence

Différentes méthodes d'extraction ont été mises en œuvre afin de comparer leur efficacité à celle de la méthode développée par MAE et de s'assurer que la composition de l'extrait optimal n'a pas été modifiée par les conditions d'extraction. Pour cela, le rendement d'extraction et l'absorbance à 500 nm des extraits à 0,5 mg/mL ont été comparés.

L'extrait optimal a d'abord été comparé à des méthodes d'extraction conventionnelles (soxhlet, chauffage sous agitation), en utilisant un solvant éthanol/eau (50/50) décrit dans la littérature pour l'extraction des anthraquinones de la garance. Ensuite, deux méthodes d'éco-extraction (extraction par liquide pressurisé et extraction assistée par ultrasons) ont été utilisées avec de l'eau afin de comparer leur efficacité à celle des micro-ondes.

Enfin, l'extraction assistée par micro-ondes a été réalisée dans les conditions déterminées par le plan d'expériences avec un solvant éthanol/eau (50/50) et avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium. L'efficacité de ces solvants déjà décrits pour l'extraction des anthraquinones de la garance a ainsi été comparée à celle de l'eau.

Ces méthodes n'ont pas toutes été optimisées afin de comparer les optima d'extraction de chacune, mais elles ont été réalisées dans des conditions classiquement utilisées au laboratoire, ou se rapprochant de méthodes décrites dans la littérature afin d'avoir une première idée du positionnement de notre extrait.

#### A. Comparaison à des méthodes d'extraction hydroalcoolique conventionnelles

##### 1. Soxhlet

Le soxhlet a été réalisé avec un solvant hydroalcoolique contenant 50% d'éthanol à une température supérieure à 100°C afin d'assurer l'évaporation des deux solvants. Un ratio de 2,5 g de garance pour 100 mL de solvant a été utilisé, correspondant à des conditions décrites dans la littérature (détails en Annexe 2) [294,311]. L'extraction a été arrêtée au bout de 4 h, après l'observation d'un solvant totalement transparent au moment du siphonage pendant plusieurs cycles consécutifs, signifiant l'épuisement du végétal en colorant.

## CHAPITRE II

Un rendement de 14,1% et une absorbance à 500 nm de 0,17 u.a. ont été obtenus pour l'extrait soxhlet. Ces deux résultats sont inférieurs à l'extrait optimal pour une extraction bien plus longue (4 h au lieu de 30 s) et qui maintient une température élevée.

### 2. Chauffage sous agitation

Une extraction longue à basse température a été comparée à la méthode d'extraction optimisée. Celle-ci a été réalisée avec le même ratio que le soxhlet (2,5 g de garance pour 100 mL d'éthanol 50%) pendant 18 h sous agitation constante à 30°C (détails en Annexe 2).

Un rendement de 16,2%, légèrement inférieur à celui obtenu par micro-ondes pour l'extrait optimal ( $21,5 \pm 0,5\%$ ) a été obtenu, ainsi qu'une absorbance de 0,38 u.a. similaire à celle de l'extrait optimal ( $0,35 \pm 0,05$  u.a.). De plus, le spectre d'absorbance de l'extrait MAE optimal est quasiment identique à celui de l'extrait obtenu par macération longue (Figure II-10).

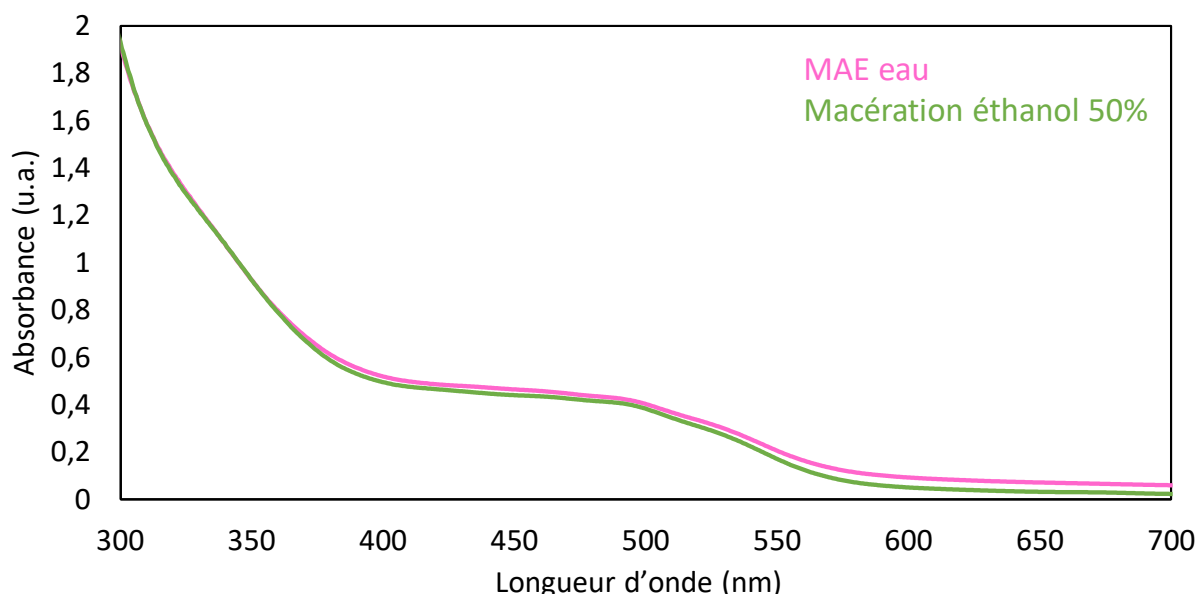


**Figure II-10 :** Spectre d'absorbance dans le visible (350-700 nm) de l'extrait optimal obtenu par MAE (extrait 13) et de l'extrait obtenu après 18 h de macération dans l'éthanol 50%.

L'extraction par MAE permet donc d'obtenir un colorant similaire à l'extraction sous agitation à 30°C pendant 18 h, en seulement 30 s. De plus, les conditions de température, de puissance de micro-onde et de pression utilisées ne dégradent pas le colorant.

### B. Comparaison à d'autres méthodes d'extraction à l'eau

#### 1. Extraction par liquide pressurisé

L'extraction par liquide pressurisé, ou extraction accélérée par solvant (ASE) a été réalisée avec 200 mg de garance placés dans une cellule de 5 mL. L'extraction à l'eau a été réalisée à

## CHAPITRE II

60°C avec une pression de 100 bars (détails en Annexe 2). Dans ces conditions, l'eau est liquide et non dans un état subcritique. La température utilisée s'apparente à celle obtenue en MAE à 200 W, mais la pression est plus élevée. Deux cycles comprenant le remplissage de la cellule, suivi d'une période d'extraction statique de 5 min, puis d'une purge de 200 s avec un volume de rinçage de 60% ont été réalisés. Le temps d'extraction statique total est de 10 min et le volume de solvant utilisé est de 8 mL, correspondant à un ratio plante/eau de 0,5 g/20 mL (ce qui est proche du ratio médian du plan d'expériences MAE de 0,55 g/20 mL).

Avec cette méthode, un rendement de 14,3% et une absorbance à 500 nm de 0,12 u.a. ont été obtenus. Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus avec la méthode optimisée par micro-ondes, mais ils sont proches de ceux obtenus par MAE à 200 W. L'extrait 10, obtenu avec une puissance de 200 W et un ratio plante/eau de 550 mg/20 mL en 3 cycles de 30 s est l'extrait du plan d'expérience dont les conditions d'extraction sont les plus comparables avec l'extrait obtenu par ASE. Son rendement (13,4%) est légèrement inférieur à celui obtenu par ASE, mais son absorbance à 500 nm est plus élevée (0,204).

D'après ces résultats, l'optimisation de l'extraction par ASE à l'eau pourrait permettre d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus par MAE. Cependant, cette méthode est moins rapide et consomme de l'azote pour la mise sous pression du système, de plus, elle ne pourrait pas être transposée chez Terre de Couleur. La MAE reste donc la méthode la plus efficace dans ce projet.

### 2. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons a été réalisée dans un bain à ultrasons opérant à 40 kHz. Une extraction de 30 min à 40°C a été réalisée avec 500 mg de garance pour 12,5 mL d'eau. Ce ratio a déjà été décrit dans la littérature pour l'extraction assistée par ultrasons des anthraquinones de la garance [296,312].

Dans ces conditions, un rendement de 9,8% et une absorbance de 0,06 u.a. ont été obtenus. L'extraction assistée par ultrasons à l'eau n'a donc pas permis d'extraire efficacement les anthraquinones de la garance des teinturiers. À la suite de ces résultats, une seconde extraction assistée par ultrasons a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant un solvant éthanol/eau (50/50) afin de comparer l'efficacité de l'UAE à la méthode optimisée, avec un solvant plus adapté à l'extraction des anthraquinones. Avec ce solvant, un rendement de 10,1%, proche de celui obtenu avec l'eau a été obtenu, tandis qu'une absorbance plus

## CHAPITRE II

élevée (0,152 u.a) a été obtenue. Ce résultat montre que l'éthanol 50% est effectivement plus adapté à l'extraction des anthraquinones par UAE que l'eau.

Néanmoins, le rendement et l'absorbance des extraits UAE sont les plus faibles parmi toutes les méthodes comparées. Cela peut en partie s'expliquer par la plus grande quantité de plante qui a pu diminuer la surface d'échange entre la plante et l'eau et empêcher une propagation homogène des ultrasons. Cependant, il est plus probable que la combinaison entre une extraction relativement courte et une température modérée n'ait pas permis la solubilisation correcte des anthraquinones quel que soit le solvant utilisé.

### C. Comparaison de différents solvants par MAE

L'extrait eau optimisé a été comparé à des extraits obtenus par MAE avec d'autres solvants en utilisant les paramètres de l'extrait 16 (5 cycles, 1000 W, 550 mg/20 mL). Un mélange hydroalcoolique composé de 50% d'éthanol, ainsi qu'une solution de NaOH à 0,75 mM (pH  $\approx$  12) ont été utilisés, les deux ayant précédemment été décrits pour favoriser l'extraction des anthraquinones de la garance [282].

#### 1. MAE hydroalcoolique

L'extraction assistée par micro-ondes a été réalisée avec le solvant éthanol 50% dans les conditions optimales pour le rendement. Un rendement de 20,7% et une absorbance de 0,35 u.a. ont été obtenus. L'extrait 16, obtenu dans les mêmes conditions d'extraction, a un rendement proche ( $21,6 \pm 1,1\%$ ), mais une couleur moins intense avec une absorbance de  $0,16 \pm 0,01$  u.a. En revanche, l'extrait hydroalcoolique est similaire à l'extrait optimal (extrait 13,  $21,5 \pm 0,5\%$  et  $0,35 \pm 0,5$  u.a.).

#### 2. MAE à pH basique

Les anthraquinones étant plus solubles à pH basique, une extraction a été réalisée avec une solution d'hydroxyde de sodium à 0,75 mM, correspondant à un pH 12. Comme pour l'extraction hydroalcoolique, les conditions de l'extrait 16 ont été utilisées. Le rendement d'extraction obtenu (23,9%) est légèrement plus élevé que celui de l'extrait 16 ( $21,6 \pm 1,1\%$ ). Cependant, son absorbance à 500 nm est légèrement plus faible (0,12 pour  $0,16 \pm 0,01$  u.a.). L'augmentation du pH du solvant d'extraction n'a donc pas permis l'amélioration de l'extraction dans ces conditions.

### D. Comparaison globale

L'extraction optimisée par MAE à l'eau permet d'obtenir un rendement et une couleur d'extrait supérieurs au soxhlet et à l'extraction sous agitation pendant 18 h, utilisés comme méthodes conventionnelles de référence avec un solvant éthanol/eau (Tableau II-5). La méthode optimisée a aussi permis d'obtenir de meilleurs résultats que les méthodes d'éco-extraction à l'eau évaluées (UAE et ASE) (Tableau II-5). Enfin, la comparaison de l'extrait aqueux à des extraits obtenus par MAE avec d'autres solvants a montré que l'augmentation du pH de l'eau n'apporte pas d'amélioration au procédé et que l'optimisation de la méthode à l'eau permet d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec le solvant hydroalcoolique (Tableau II-5).

**Tableau II-5 :** Comparaison des conditions d'extraction des méthodes décrites.

| Méthode   | Solvant        | Temp. (°C) | Durée  | Ratio<br>(mg/20 mL) | Rendement<br>(%) | Abs. à 500<br>nm (u.a.) |
|-----------|----------------|------------|--------|---------------------|------------------|-------------------------|
| MAE (13)  | Eau            | ≈140       | 30 s   | 100                 | 21,5 ± 0,5       | 0,35 ± 0,05             |
| MAE (16)  | Eau            | ≈140       | 5x30 s | 550                 | 21,6 ± 1,1       | 0,16 ± 0,01             |
| Soxhlet   | EtOH 50%       | ≈ 100      | 4 h    | 500                 | 14,1             | 0,17                    |
| Agitation | EtOH 50%       | 30         | 18 h   | 500                 | 16,2             | 0,38                    |
| ASE       | Eau            | 60         | 10 min | 500                 | 14,3             | 0,20                    |
| UAE       | Eau            | 40         | 30 min | 800                 | 9,8              | 0,06                    |
| UAE       | EtOH 50%       | 40         | 30 min | 800                 | 10,1             | 0,15                    |
| MAE       | EtOH 50%       | ≈140       | 5x30 s | 550                 | 20,7             | 0,35                    |
| MAE       | NaOH (0,75 mM) | ≈140       | 5x30 s | 550                 | 23,9             | 0,12                    |

L'extrait optimal obtenu par MAE à l'eau possède non seulement le rendement et l'absorbance à 500 nm les plus élevés parmi les extractions testées, mais c'est aussi la méthode la plus rapide avec seulement 30 s d'extraction (Tableau II-5).

## V. Composition de l'extrait optimisé

L'extrait optimisé, obtenu par MAE avec 100 mg de garance pour 20 mL d'eau à 1000 W pendant un cycle de 30 s, a été caractérisé afin de connaître sa composition et sa teneur en composés d'intérêt. Dans un premier temps, les familles moléculaires présentes dans l'extrait ont été détectées par chromatographie sur couche mince haute performance ou dosées par des méthodes colorimétriques. L'extrait a ensuite été analysé par UHPLC-HRMS/MS afin d'identifier ses principaux composés, ainsi que ceux responsables de sa couleur.

### A. Détection des sucres par HR-CCM

## CHAPITRE II

Le profil du chromatogramme obtenu en HPLC-DAD-DEDL (méthode en annexe 6) montre la présence de molécules très polaires qui ne possèdent pas de chromophore (Figure II-11).

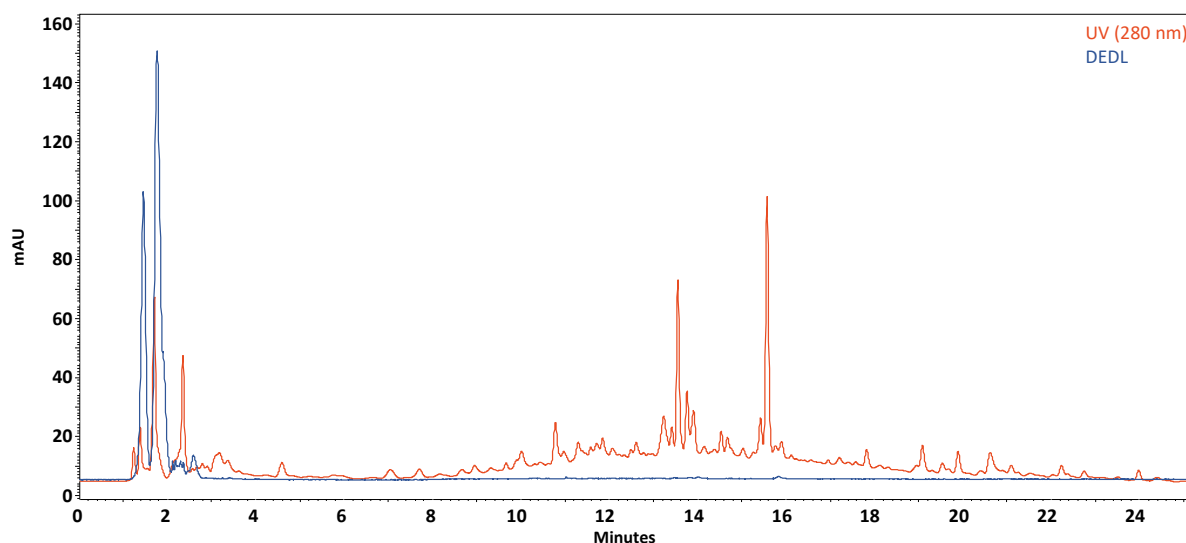


**Figure II-11** : Chromatogramme UV à 280 nm (orange) et DEDL (bleu) de l'extrait MAE optimal.

Cette description peut correspondre à la présence de sucres dans l'extrait, une hypothèse corroborée par le rendement d'extraction plus élevé à l'eau qu'avec l'éthanol 50% dans les mêmes conditions d'extraction.

La chromatographie sur couche mince haute performance (HR-CCM) a été choisie pour détecter les sucres car elle permet une détermination rapide des sucres simples classés par nombre d'unités saccharidiques (oses) et des composés glycosylés. En effet, l'élution des molécules dépend de leur affinité à la phase stationnaire. Ici, une plaque de silice polaire a été utilisée, ce qui signifie que les composés les plus polaires seront mieux retenus par la phase stationnaire, en raison de leur affinité avec celle-ci. Le rapport frontal (le rapport entre la distance d'élution du composé et la distance du front de solvant) des molécules sera donc plus élevé pour les molécules apolaires. Dans le cas des sucres, plus le nombre d'oses augmente, plus le nombre de groupements hydroxyles en interaction avec la phase stationnaire est élevé et plus leur rapport frontal est faible.

## CHAPITRE II

Une méthode d'élution et de révélation développée précédemment dans le laboratoire a été utilisée (Annexe 5) [321]. Des standards de monosaccharides (glucose et mannose), trisaccharide (maltotriose), pentasaccharide (maltopentose) et heptasaccharide (maltoheptaose) ont été déposés aux côtés de l'extrait optimisé et le révélateur Molisch a été utilisé afin de révéler spécifiquement les sucres (Figure II-12).

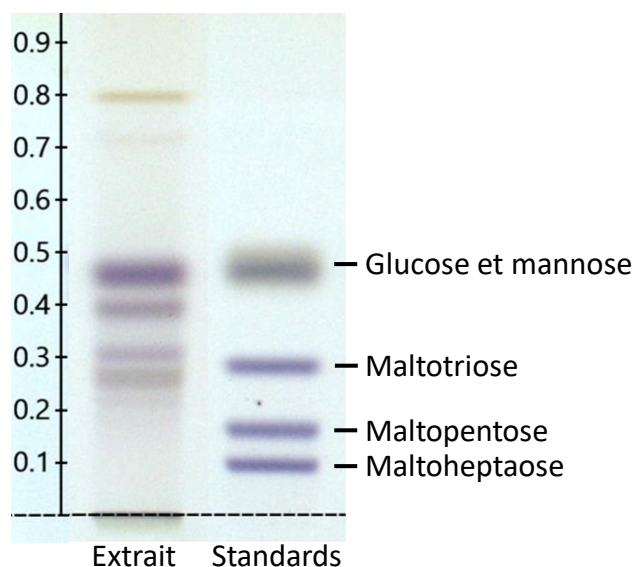


**Figure II-12 :** Plaque HR-CCM obtenue après la séparation et la révélation des sucres de l'extrait optimisé et des standards. L'échelle des rapports frontaux (Rf) est affichée. Phase stationnaire : silice gel60 F<sub>254</sub>, phase éluante : acétonitrile/eau 75/25.

Le rapport frontal (Rf) est un outil permettant de guider l'identification des composés par CCM. En effet, dans les mêmes conditions d'élution (phase stationnaire et phase mobile, température et humidité) une molécule conserve toujours le même rapport frontal. Grâce à cela, il est possible de comparer l'extrait à des standards élués dans les mêmes conditions.

Les monosaccharides du standard forment une large bande à un Rf de 0,47, à laquelle correspond une bande de l'extrait (Rf = 0,46). Les oligosaccharides sont séparés en 3 bandes, à des Rf de 0,29 (maltotriose), 0,17 (maltopentose) et 0,09 (maltoheptaose) (Figure II-12). L'extrait présente une bande à un Rf de 0,40 pouvant correspondre à un disaccharide et deux ou trois bandes à des Rf compris entre 0,28 et 0,32 qui pourraient correspondre à des tri ou tétrasaccharides (Figure II-12). Il n'y a aucune bande à un Rf < 0,2 pouvant correspondre à des sucres de 5-7 unités. En revanche, une bande non éluee a été révélée, suggérant la présence de polysaccharides avec plus de 7 unités (Figure II-12). Enfin, les bandes révélées à un Rf de 0,72 et 0,81 pourraient correspondre à des polyphénols (anthraquinones ou flavonoïdes) glycosylés (Figure II-12).

### B. Dosage des composés phénoliques totaux et anthraquinones

Les principales familles moléculaires décrites dans la garance des teinturiers ont été dosées. Il s'agit des composés phénoliques totaux et, de manière plus spécifique, des anthraquinones. Le dosage des flavonoïdes totaux par la méthode de complexation d' $\text{AlCl}_3$  n'a pas été réalisé en raison de l'absorbance de l'extrait à la longueur d'onde utilisée pour ce dosage (430 nm) qui provoque une interférence.

#### 1. Dosage des composés phénoliques totaux : méthode de Folin-Ciocalteu

Pour le dosage des composés phénoliques totaux, la méthode de Folin-Ciocalteu a été réalisée dans les conditions décrites par Grigoras *et al.* (Annexe 4) [322]. Cette méthode est basée sur un transfert d'électron entre les composés phénoliques et le réactif de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange de complexes phosphomolybdique et phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} + \text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) de couleur jaune [323]. Le dosage est réalisé dans une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 10) dont le pH basique cause la déprotonation de groupements -OH portés par les composés phénoliques. Ces conditions permettent une réaction d'oxydo-réduction entre le composé phénolique et le réactif de Folin-Ciocalteu [323]. Celui-ci est alors réduit et prend une couleur bleue qui est mesurée par un spectrophotomètre à 760 nm [322].

Afin de réaliser le dosage des composés phénoliques totaux de l'extrait optimisé, une gamme d'acide gallique a été préparée entre 0,05 et 0,40 mg/mL, correspondant à une concentration de 5 à 40  $\mu\text{g/mL}$  dans le puits. Une droite d'étalonnage d'équation  $y = 37,757x + 0,011$  a été obtenue, avec un  $R^2 = 0,9995$  (Figure II-13).

## CHAPITRE II

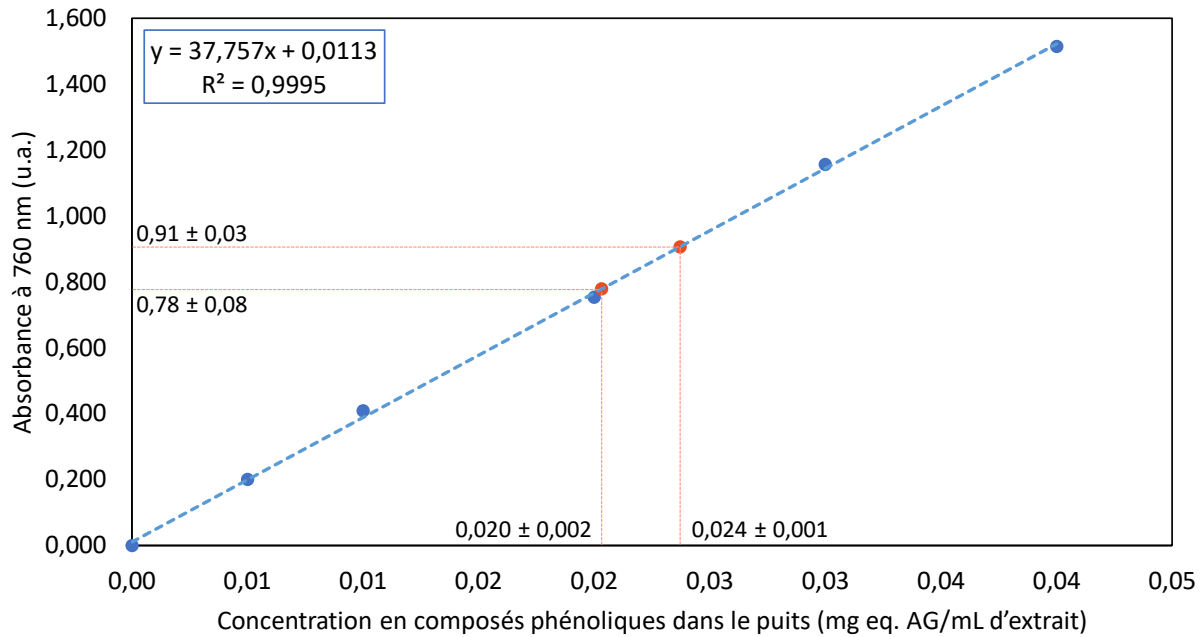


**Figure II-13 :** Dosage des composés phénoliques totaux. En bleu la droite d'étalonnage de l'acide gallique et en orange le dosage des deux répliquats de l'extrait optimisé de garance.

Celle-ci a été utilisée pour calculer la teneur en composés phénoliques totaux dans deux répliquats indépendants de l'extrait optimal préparé à 10 mg/mL soit 1mg/mL dans le puits (Equation II-2 A). La concentration obtenue en mg d'équivalent acide gallique (eq. AG) par mL d'extrait a ensuite été convertie en mg d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec (Equation II-2 B).

$$[\text{phénoliques}]_{\text{puits}} (\text{mg eq. AG/mL}) = \frac{(Abs_{\text{extrait}} - Abs_{\text{blanc}}) - b}{a} \quad (\text{II-2 A})$$

$$[\text{phénoliques}]_{\text{extrait}} (\text{mg eq. AG/g}_{\text{extrait sec}}) = \frac{[\text{phénoliques}]_{\text{puits}}}{[\text{extrait}]_{\text{puits}}} \times 1000 \quad (\text{II-2 B})$$

Avec [...]puits : la concentration dans le puits (correspondant à une dilution par 10 de l'extrait), Abs<sub>extrait</sub> et Abs<sub>blanc</sub> : la moyenne de l'absorbance à 760 nm des trois puits correspondant à l'extrait ou au solvant, *a* et *b* la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage.

Les concentrations en composés phénoliques totaux obtenues pour les deux extraits sont de 0,020 ± 0,002 mg eq. AG/mL et 0,024 ± 0,001 mg eq. AG/mL d'extrait dans le puits, soit 20,3 ± 2,0 et 23,7 ± 0,7 mg eq. AG/g d'extrait sec (Figure II-13). Ainsi, il y a environ 2,2% de composés phénoliques dans l'extrait sec de garance.

Le dosage de Folin-Ciocalteu est généralement utilisé pour estimer la teneur en composés phénoliques totaux en utilisant l'acide gallique comme référence [63,323]. Cependant, les principaux composés phénoliques décrits dans la garance sont des anthraquinones, des flavonoïdes et des acides cinnamiques, dont la structure est différente de celle de l'acide

## CHAPITRE II

gallique. Pour déterminer la réponse de ce type de composés lors du dosage de Folin-Ciocalteu, la teneur en composés phénoliques de solutions standards de concentration connue d'alizarine, de rutine et d'acide chlorogénique a été mesurée parallèlement à l'extrait (Tableau II-6).

**Tableau II-6 :** Dosage de Folin-Ciocalteu de l'alizarine, de la rutine et de l'acide chlorogénique.

|                        | [C] <sub>préparée</sub><br>(µg/mL) | Abs. à 760 nm<br>(u.a.) | [C] <sub>calculée</sub><br>(µg eq. AG/mL) |
|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|
| Acide gallique (gamme) | 30                                 | 1,193 ± 0,022           | 30,3 ± 0,6                                |
| Alizarine              | 30                                 | 0,280 ± 0,028           | 7,1 ± 0,7                                 |
| Rutine                 | 30                                 | 0,273 ± 0,006           | 6,9 ± 0,2                                 |
| Acide chlorogénique    | 30                                 | 0,271 ± 0,026           | 6,9 ± 0,7                                 |

Les solutions standard ont toutes été préparées à 30 µg/mL dans le puits. Cependant, l'absorbance à 760 nm après la réaction d'oxydo-réduction entre les molécules et le réactif de Folin-Ciocalteu est plus faible pour les trois standards testés que pour l'acide gallique (Tableau II-6). Ainsi, la concentration calculée par le dosage de Folin-Ciocalteu en utilisant la courbe d'étalonnage faite avec l'acide gallique est de 7,1 ± 0,7 µg eq. AG/mL pour l'alizarine, 6,9 ± 0,2 µg eq. AG/mL pour la rutine et 6,9 ± 0,7 µg eq. AG/mL pour l'acide chlorogénique.

Ces trois molécules, bien qu'elles soient des composés phénoliques, réagissent donc moins fortement avec le réactif de Folin-Ciocalteu que l'acide gallique, ce qui conduit à une sous-estimation de leur concentration lorsqu'une gamme d'acide gallique est utilisée. En effet, la réponse d'un composé au dosage de Folin-Ciocalteu dépend de sa capacité réductrice. Celle-ci est directement liée à la structure moléculaire et notamment au nombre et à la position des groupements hydroxyles [323]. Par exemple, un groupement galloyl comme celui de l'acide gallique augmente la capacité réductrice par rapport à un groupement catéchol, qu'on retrouve sur l'alizarine, la rutine et l'acide chlorogénique [323]. Ces résultats indiquent que la concentration en composés phénoliques totaux de l'extrait de garance pourrait être sous-estimée.

### 2. Dosage des anthraquinones

Afin d'apprécier la teneur en colorant de l'extrait optimal, la concentration en anthraquinones des deux réplicats d'extraction a été mesurée à partir d'une gamme d'étalonnage d'alizarine. La gamme d'alizarine, préparée entre 0,5 et 50 µg/mL, a permis de tracer une droite d'étalonnage d'équation  $y = 0,0149x + 0,0381$  puis de calculer la concentration en

## CHAPITRE II

anthraquinones en utilisant le même calcul que pour les polyphénols (Figure II-14). La moyenne de la concentration en anthraquinones des deux extraits est de  $24,5 \pm 2,3$   $\mu\text{g}$  eq. alizarine/mL d'extrait, soit  $44,4 \pm 4,6$  mg eq. alizarine/g d'extrait sec. Il y a donc environ 4,5% de colorant dans l'extrait sec, soit environ 0,97% d'alizarine dans la poudre de plante.

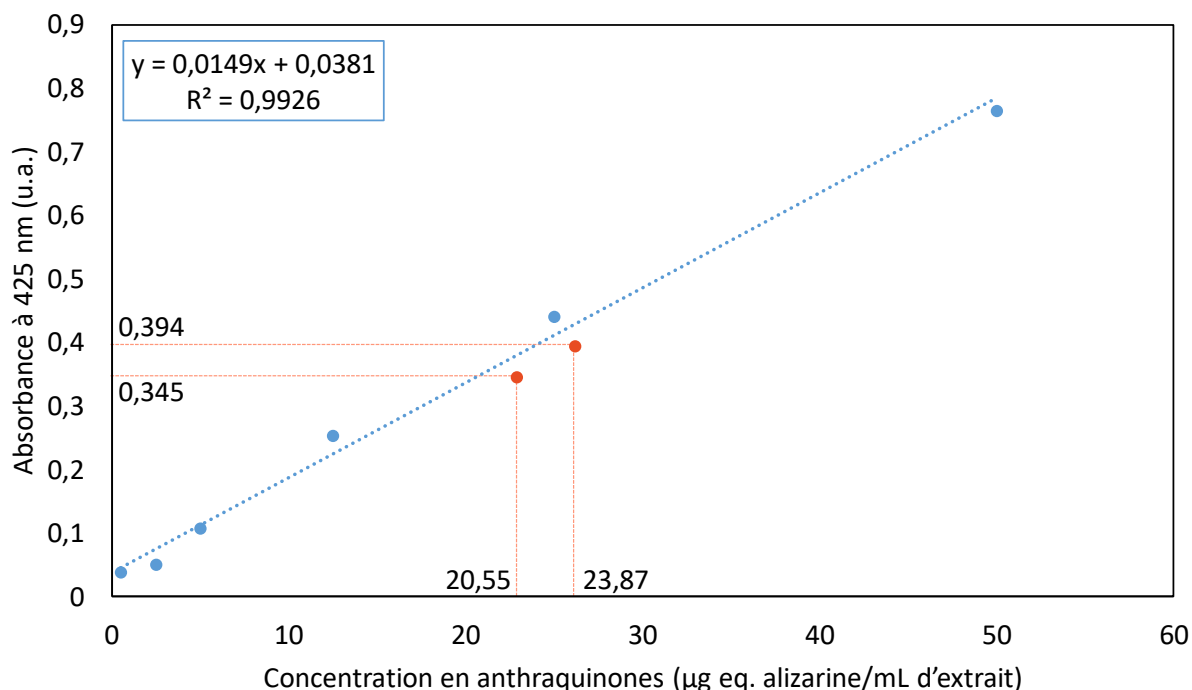


**Figure II-14 :** Dosage des anthraquinones. En bleu la droite d'étalonnage de l'alizarine et en orange le dosage des deux répliquats de l'extrait optimisé de garance.

Plusieurs méthodes de dosage ciblé par HPLC des anthraquinones de la garance des teinturiers ont été décrites [309,311,314]. Dabiri *et al.* ont dosé l'alizarine et la purpurine dans différentes accessions de garance des teinturiers et obtenu une concentration massique (respectivement 0,08% - 0,40% pour l'alizarine et 0,02% - 0,21% pour la purpurine) du même ordre de grandeur que le nôtre [311]. De Santis *et al.* ont dosé l'alizarine dans plusieurs extraits de garance et obtenu des résultats plus faibles que ceux décrits ici ( $1,5 \pm 0,2$  mg/g au plus haut) [314]. Enfin, Derksen *et al.* ont dosé les principales anthraquinones (acide rubérythrique, alizarine, lucidine primevéroside et nordamnacanthol) de plusieurs cultivars de *Rubia tinctorum* et ont obtenu environ 50 à 90 mg/g d'anthraquinones total en fonction des cultivars, ce qui est plus élevé que notre résultat [309].

### C. Identification des principaux composés par UHPLC-HRMS/MS

Les principaux composés de l'extrait optimisé ont été identifiés par UHPLC-DAD-HRMS/MS (Figure II-15) (méthode en Annexe 7).

## CHAPITRE II

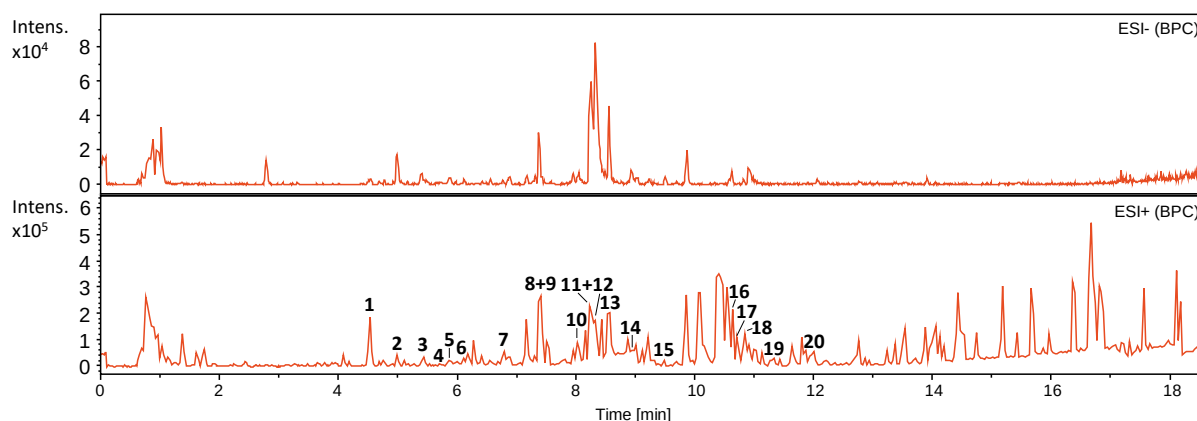


**Figure II-15** : Chromatogrammes UHPLC-ESI-QTOF de l'extrait optimal. Chromatogrammes ESI en mode négatif en haut (BPC), et en mode positif en bas (BPC).

Pour chaque pic détecté, une formule moléculaire a été proposée avec une tolérance de 3 ppm pour la MS et de 10 ppm pour la MS/MS. Les adduits  $[M+Na]^+$  et la comparaison des données obtenues en ionisations positive et négative ont été utilisés pour corroborer les formules moléculaires. Ces dernières ont ensuite été soumises à des bases de données publiques (SciFinder, KNapSack et Pubchem) et comparées à la littérature afin de suggérer une identification putative pour chaque composé. Le Tableau II-7 récapitule le temps de rétention, le  $m/z$ , la formule moléculaire, la description des fragments, les  $\lambda_{\max}$  et la proposition d'identification pour chaque composé.

### 1. Anthraquinones

L'identification des anthraquinones a été guidée par leur schéma de fragmentation en ionisation négative. La plupart des anthraquinones présentent une perte de CO (28 u) correspondant à la fragmentation de la cétone. De plus, en accord avec les descriptions de la littérature, pour les anthraquinones portant un acide ou un alcool en  $\alpha$  de la cétone, une perte de CO<sub>2</sub> (44 u) a généralement été détectée, tandis qu'une perte d'H<sub>2</sub>O (18 u) a parfois été détectée pour les anthraquinones hydroxylées [294,324]. Le sucre porté par les anthraquinones glycosylées décrites dans *Rubia tinctorum* est généralement un glucose ou un primevérose (xylose-glucose) qui correspondent respectivement à des pertes de 162 u et 294 u (132 u + 162 u) [282,286]. Toutes les pertes pouvant correspondre à ces sucres à partir des anthraquinones ont donc été proposés comme tel.

Le composé **2** a été détecté à  $m/z$  593,1135 ( $[M-H]^-$ ) et  $\lambda_{\max}$  252, 284, 432 nm, avec comme proposition de formule C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>O<sub>16</sub>. Des fragments correspondant à des pertes de CO<sub>2</sub> (44 u) et primevérose (294 u) ont été détectés à  $m/z$  549,1213 et 255,0224. D'après ces informations,

## CHAPITRE II

le composé **2** a été identifié comme étant la galiosine, une anthraquinone glycosylée décrite chez *Rubia tinctorum* [282].

Le composé **8** a été détecté à  $m/z$  563.1414 ( $[M-H]^-$ ) avec  $\lambda_{\max}$  276, 305 (sh), 336, 416 nm. La formule proposée pour ce composé est  $C_{26}H_{28}O_{14}$ . Un fragment a été détecté à  $m/z$  269,0432 après la perte de primevérose (294 u). La formule proposée pour la génine est  $C_{15}H_{10}O_5$ . Celle-ci, ainsi que le spectre d'absorption, correspondent à la lucidine. D'après ces informations, le composé **8** serait la lucidine primevéroside, une des anthraquinones majeures de la garance des teinturiers [282].

Le composé **9** a été détecté à  $m/z$  577,1564 ( $[M-H]^-$ ), menant à la proposition de formule  $C_{27}H_{30}O_{14}$ . Le  $\lambda_{\max}$  276, 305 (sh), 345, 416 (br) nm et la masse détectée de la génine  $m/z$  269,0496 du composé **9** sont identiques à ceux du composé **8**. Pour le composé **9**, une perte de 308 u correspondant aux désoxyhexose et glucose a mené à l'obtention de la lucidine. Le composé **9** pourrait donc être la lucidine-désoxyhexose-glucose, une forme encore non décrite de la lucidine. Ce type de glycosylation n'a pas été décrit dans *Rubia tinctorum*, mais existe dans *Rubia cordifolia* [286].

Le composé **13** a été détecté à  $m/z$  619,1650 ( $[M-H]^-$ ) et 621,1798 ( $[M+H]^+$ ) avec  $\lambda_{\max}$  248, 288, 432 (br) nm. La formule proposée pour ce composé est  $C_{29}H_{32}O_{15}$ . Deux fragments ont été détectés en mode positif à  $m/z$  475,1231 et 271,0587 après la perte d'un désoxyhexose (146 u) et d'un acétylhexose (204 u). Le spectre d'absorption et la masse exacte de la génine correspondent à la lucidine, dont plusieurs dérivés glycosylés ont été décrits précédemment. Le composé **13** serait donc une lucidine-acétylglucose-désoxyhexose, un composé qui n'a pas été décrit dans la littérature. En revanche, ce type de glycosylation a déjà été décrit pour un isomère de la lucidine, la 6-hydroxyrubiadine, une anthraquinone spécifique de *Rubia akane* [290].

Le composé **11** a été détecté à  $m/z$  299,0173 ( $[M-H]^-$ ) et  $\lambda_{\max}$  256, 284 (sh), 328 (sh), 492 (br) nm, et le composé **12** à  $m/z$  283,0229 ( $[M-H]^-$ ) et  $\lambda_{\max}$  248, 288, 432 (br) nm. Le composé **14** a été détecté à  $m/z$  267,0283 ( $[M-H]^-$ ) et  $\lambda_{\max}$  276, 341, 452 (br) nm, le composé **17** à  $m/z$  239,0338 et  $\lambda_{\max}$  281, 339, 425 nm et le composé **20** à  $m/z$  253,0495 ( $[M-H]^-$ ) et  $\lambda_{\max}$  276, 408 (br) nm. Les formules proposées pour ces composés sont  $C_{15}H_8O_7$  (**11**),  $C_{15}H_8O_6$  (**12**),  $C_{15}H_8O_5$  (**14**),  $C_{14}H_8O_4$  (**17**) and  $C_{15}H_{10}O_4$  (**20**). La perte consécutive de  $CO_2$  (44 u) et de CO (28 u) a été détectée pour tous ces composés. Les formules moléculaires, les profils de fragmentation et

## CHAPITRE II

les spectres d'absorption ont mené à l'identification de la pseudopurpurine (**11**), de la munjistine (**12**), du nordamnacanthal (**14**), d'une dihydroxyanthraquinone, certainement l'alizarine (**17**), et de la rubiadine (**20**), toutes des anthraquinones décrites dans la garance des teinturiers [282,324].

Le composé **15** a été détecté à  $m/z$  269,0438 ( $[M-H]^-$ ) et  $\lambda_{\max}$  276, 305 (sh), 340, 416 (br) nm. Ces données, ainsi que la formule moléculaire proposée  $C_{15}H_{10}O_5$ , pourraient correspondre à la génine des composés **8**, **9** et **13**, la lucidine. Plusieurs fragments ont été détectés en mode négatif à  $m/z$  251,0295, 223,0418, et 195,0414, correspondant aux pertes consécutives de  $H_2O$  (18 u) et de deux CO (28 u). Un autre fragment a été détecté à  $m/z$  239,0309, correspondant à la perte de  $CH_2O$  (30 u). Ce profil de fragmentation a été décrit pour l'aloé-émodine, une anthraquinone qui n'a pas été décrite dans *Rubia tinctorum*, mais qui correspond à un isomère de position de la lucidine [324,325]. Le composé **15** a donc été attribué à la lucidine.

Le composé **18** a été détecté à  $m/z$  255,0277 ( $[M-H]^-$ ) et  $\lambda_{\max}$  253, 288, 480 (br), 515 nm. La formule moléculaire proposée pour ce composé est  $C_{14}H_8O_5$ . Un fragment a été détecté en mode négatif à  $m/z$  227,0297 après la perte de la cétone (28 u). A partir de ces résultats, le composé **18** a été identifié comme étant la purpurine, une des principales anthraquinones de la garance des teinturiers [282,324].

Le composé **19** a été identifié à  $m/z$  287,0548 ( $[M+H]^+$ ) et  $\lambda_{\max}$  255, 287, 476 (br) nm, menant à la proposition de formule moléculaire  $C_{15}H_{10}O_5$ . Des fragments ont été détectés à  $m/z$  255,0265, 237,0150, 227,0339 et 199,0405, correspondant à la perte de  $CH_4O$  (32 u), suivie par la perte de  $H_2O$  (18 u) et à la perte de 2 groupements CO (28 u). Le composé **19** serait donc une trihydroxy-hydroxyméthylantraquinone. Un tel composé n'a jamais décrit dans *Rubia tinctorum*, mais la plante contient plusieurs mono et dihydroxy-hydroxyméthylantraquinones [282].

### 2. Acides phénoliques et flavonoïdes

Le composé **1** a été détecté en mode positif à  $m/z$  355,0989 et  $\lambda_{\max}$  277, 330 nm. La formule proposée pour ce composé est  $C_{16}H_{18}O_9$ . Elle pourrait correspondre à l'acide chlorogénique, un composé précédemment décrit dans la garance des teinturiers [286]. Un fragment caractéristique a été détecté à  $m/z$  163,0385, qui correspond à la formule du dérivé d'acide caféique ( $C_9H_7O_3$ ) obtenu après la rupture de la liaison ester [326].

## CHAPITRE II

Les composés **3** à **6** ont été détectés en mode positif à  $m/z$  743,2041, 597,1459, 611,1608 et 465,1019 avec un  $\lambda_{\max}$  proche de 260 et 350 nm. Tous ces composés donnent un fragment commun détecté à  $m/z$  303,05 après diverses pertes de sucres. La masse de la génine et le spectre d'absorption des composés correspondent au composé **10**, détecté à  $m/z$  303,0503 ( $MS^+$ ). Le profil de fragmentation du composé **10** correspond au profil de fragmentation décrit dans la littérature pour la quercétine [321,327]. La quercétine n'est pas décrite dans la garance des teinturiers, mais plusieurs de ses dérivés glycosylés le sont [286,293]. Les composés **3** à **6** ont donc été attribués à des formes glycosylées de la quercétine. Le composé **3** s'est fragmenté en quercétine après la perte de 132 u, 146 u et 162 u, correspondant à un aldopentose, un désoxyhexose et un hexose. Une quercétine avec ce type de glycosylation n'a jamais été décrite dans *Rubia tinctorum*. Cependant, le calabricoside A (quercétine rhamnose-arabinose-glucose) a été décrite dans *Putoria calabrica*, une autre Rubiaceae [328]. Deux fragments du composé **4** ont été identifiés à la suite de la perte d'un aldopentose (132 u) et d'un hexose (162 u). Ce type de glycosylation n'a pas été décrit pour la quercétine dans la garance des teinturiers, mais pourrait correspondre à la quercétine sambubioside, précédemment identifiée dans *Hedyotis diffusa*, une autre Rubiaceae [329]. Le composé **5** se fragmente en quercétine après la perte de rhamnose (146 u) et de glucose (162 u). Elle a été identifiée comme étant la rutine, un flavonoïde décrit dans *Rubia tinctorum* [286]. Enfin, une perte d'hexose (162 u) a été identifiée pour le composé **6**. Celui-ci a été attribué à l'hypéroside (quercétine-galactoside), un composé décrit dans la garance des teinturiers [286].

Le composé **7** a été détecté en  $MS^-$  à  $m/z$  563,1394 et  $\lambda_{\max}$  280, 330 (br) nm, avec comme proposition de formule moléculaire  $C_{26}H_{28}O_{14}$ . Après la perte d'un aldopentose (132 u) et d'un hexose (162 u), un fragment correspondant à la génine a été détecté à  $m/z$  269,0399. Cette masse et le spectre d'absorption du composé correspondent au composé **16** ( $m/z$  269,04). La proposition de formule moléculaire correspondant à cette masse exacte est  $C_{15}H_{10}O_5$ . Le composé **16** possède un profil de fragmentation correspondant à celui des flavonoïdes avec des fragments détectés à  $m/z$  254,0176 ( $-CH_3$ , 15 u), 241,0456 ( $-CO$ , 28 u), 226,0231 ( $-CH_3-CO$ , 43 u), 223,0381 ( $-CO-H_2O$ , 46 u), 213,0187 ( $-CO-C_2H_4$ , 56 u), 211,0360 ( $-CO-CH_2O$ , 58 u), 199,0376 ( $-CO-C_2H_2$ , 70 u), 195,0418 ( $-2CO-H_2O$ , 74 u), et 182,0366 ( $-CO_2-CO-CH_3$ , 87 u) [321,327]. Le composé **16** a été attribué à l'apigénine, le seul flavonoïde correspondant à la

## CHAPITRE II

formule  $C_{15}H_{10}O_5$  décrit dans la garance des teinturiers [293]. Le composé **7** correspond donc à une apigénine aldopentose-hexose, une forme qui n'a pas été décrite dans les Rubiaceae.

## CHAPITRE II

**Tableau II-7 :** Caractérisation de l'extrait optimal par UHPLC-DAD-HRMS/MS.

| #  | Tr<br>(min) | m/z<br>([M+H] <sup>+</sup> ) | Erreur<br>(ppm) | m/z<br>([M-H] <sup>-</sup> ) | Erreur<br>(ppm) | Formule                                         | MS/MS <sup>+</sup><br>(intensité)                                                         | MS/MS <sup>-</sup><br>(intensité)                  | λ <sub>max</sub> (nm)           | Hypothèse d'identification                      |
|----|-------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1  | 4,55        | 355,0989                     | 0               |                              |                 | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>  | 163,0385 (6081)<br>145,0260 (1207)<br>135,0442 (1017)<br>117,0353 (740)<br>107,0488 (408) |                                                    | 277, 330                        | Acide chlorogénique                             |
| 2  | 5,01        | N.D.                         | -               | 593,1135                     | 2,3             | C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>16</sub> | -                                                                                         | 549,1213 (3075)<br>255,0224 (1874)                 | 252, 284, 432                   | Galiosine                                       |
| 3  | 5,41        | 743,2041                     | -1,1            | 741,1845                     | -2,7            | C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>20</sub> | 611,1614 (1054)<br>465,1093 (308)<br>303,0526 (377)                                       | -                                                  | 270, 353                        | Quercétine glycosylée<br>(déoxyhexose + hexose) |
| 4  | 5,65        | 597,1459                     | 0,0             | 595,133                      | 1,6             | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub> | 465,0962 (1235)<br>303,0471 (391)                                                         | -                                                  | 260, 355                        | Quercétine<br>(aldopentose + hexose)            |
| 5  | 5,86        | 611,1608                     | 0,5             | 609,1472                     | -1,9            | C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub> | 465,1042 (3613)<br>303,0529 (559)                                                         | 301,0331 (668)                                     | 257, 350                        | Rutine                                          |
| 6  | 6,13        | 465,1019                     | 1,7             | 463,0874                     | 1,8             | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 303,0511 (3050)                                                                           | 300,0225 (2713)                                    | 264, 350                        | Hypéroside                                      |
| 7  | 6,78        | N.D.                         |                 | 563,1394                     | 2,2             | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub> | -                                                                                         | 269,0399 (1740)<br>251,0335 (334)                  | 280, 330 (br)                   | Apigénine glycosylée<br>(aldopentose + hexose)  |
| 8  | 7,32        | 565,1553                     | -0,2            | 563,1414                     | -1,3            | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub> | -                                                                                         | 269,0432 (1382)                                    | 276, 305 (sh), 336,<br>416      | Lucidine primevéroside                          |
| 9  | 7,39        | 579,1695                     | 2,3             | 577,1564                     | -0,2            | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub> | -                                                                                         | 269,0496 (3421)                                    | 276, 305 (sh), 345,<br>416 (br) | Lucidine<br>(déoxyhexose + hexose)              |
| 10 | 8,03        | 303,0503                     | -1,0            | 301,0332                     | 8,2             | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>  | 257,0429 (752)<br>247,0569 (309)<br>239,0195 (185)                                        | 273,0346 (207)<br>257,0308 (104)<br>245,0413 (237) | 272, 368                        | Quercétine                                      |

## CHAPITRE II

|    |      |          |      |          |     |                                                 |                  |                  |                    |                             |
|----|------|----------|------|----------|-----|-------------------------------------------------|------------------|------------------|--------------------|-----------------------------|
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 229,0508 (957)   | 178,9980 (470)   |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 201,0561 (770)   | 164,0093 (270)   |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 165,0176 (947)   | 151,0027 (1325)  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 153,0175 (1632)  | 121,0285(278)    |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 149,0237 (376)   |                  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 137,0228 (1222)  |                  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 121,0287 (692)   |                  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 111,0079 (326)   |                  |                    |                             |
| 11 | 8,25 | 301,0347 | -1,4 | 299,0173 | 5,6 | C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>   | 283,0233 (4995)  | 255,0273 (56787) | 256, 284 (sh), 328 | Pseudopurpurine             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 273,0419 (1928)  | 227,0347 (26091) | (sh), 492 (br)     |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 245,0412 (3174)  | 199,0372 (520)   |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 231,0264 (3092)  | 183,0431 (2059)  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 227,0300 (12919) | 171,0444 (2032)  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 213,0215 (7041)  | 129,0353 (812)   |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 199,0369 (3634)  |                  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 187,0374 (4122)  |                  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 181,0328 (2458)  |                  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 175,0374 (976)   |                  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 171,0453 (1000)  |                  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 157,0259 (4415)  |                  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 143,0472 (507)   |                  |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 129,0334 (1361)  |                  |                    |                             |
| 12 | 8,32 | 285,0394 | 0,0  | 283,0229 | 6,9 | C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>   | 267,0304 (20184) | 265,0066 (2300)  | 248, 288, 432 (br) | Munjistine                  |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 249,0198 (2216)  | 239,0350 (66054) |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 227,0337 (1135)  | 211,0353 (24985) |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 213,0210 (1019)  | 195,0451 (21570) |                    |                             |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 211,0387 (1316)  | 167,0481 (2117)  |                    |                             |
| 13 | 8,58 | 621,1798 | 2,6  | 619,1650 | 3   | C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub> | 475,1231 (4996)  | 269,0430 (3603)  | 276, 306 (sh.),    | lucidine glycosylée         |
|    |      |          |      |          |     |                                                 | 271,0587 (1394)  |                  | 340, 420 (br)      | (acétylglucose déoxyhexose) |

## CHAPITRE II

|    |       |          |      |          |     |                                                |                                                                                                          |                                                                                                                                                                |                                 |                                     |
|----|-------|----------|------|----------|-----|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| 14 | 8,95  | 269,0445 | -0,2 | 267,0283 | 5,9 | C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>  | 223,0390 (211)<br>195,0357 (634)<br>167,0558 (540)<br>139,0512 (385)<br>120,0807 (205)<br>105,0343 (329) | 223,0373 (10478)<br>195,0411 (2660)                                                                                                                            | 276, 341, 452 (br)              | Nordamnacanthal                     |
| 15 | 9,52  | 271,0597 | 1,6  | 269,0436 | 7,3 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> | -                                                                                                        | 251,0295 (3615)<br>239,0309 (265)<br>223,0418 (233)<br>195,0414 (384)<br>179,0508 (314)                                                                        | 276, 305 (sh), 340,<br>416 (br) | Lucidine                            |
| 16 | 10,63 | 271,0608 | 2,5  | 269,0438 | 6,5 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> | 228,0415 (151)<br>215,0408 (225)                                                                         | 254,0176 (477)<br>241,0456 (512)<br>226,0231 (425)<br>223,0381 (733)<br>213,0187 (411)<br>211,0360 (290)<br>199,0376 (255)<br>195,0418 (432)<br>182,0366 (327) | 261, 350 (br)                   | Apigénine                           |
| 17 | 10,83 | 241,0496 | -0,1 | 239,0338 | 4,9 | C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>  | -                                                                                                        | 211,0349 (819)<br>195,0486 (353)<br>183,0426 (106)<br>158,9252 (112)<br>155,0532 (87)<br>135,5830 (51)                                                         | 281, 339, 425                   | Dihydroxyanthraquinone<br>Alizarine |
| 18 | 10,94 | 257,0444 | -0,2 | 255,0277 | 8,8 | C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>  | 169,0335 (546)                                                                                           | 227,0297 (4771)                                                                                                                                                | 253, 288, 480 (br),<br>515      | Purpurine                           |

## CHAPITRE II

|    |       |          |     |          |     |                                                |                 |                 |                    |                                           |
|----|-------|----------|-----|----------|-----|------------------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-------------------------------------------|
| 19 | 11,35 | 287,0548 | 0,6 | N.D.     | -   | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> | 255,0265 (994)  | -               | 255, 287, 476 (br) | Trihydroxy-<br>hydroxyméthylanthraquinone |
|    |       |          |     |          |     |                                                | 237,0150 (1104) |                 |                    |                                           |
|    |       |          |     |          |     |                                                | 227,0339 (411)  |                 |                    |                                           |
|    |       |          |     |          |     |                                                | 199,0405 (811)  |                 |                    |                                           |
|    |       |          |     |          |     |                                                | 181,0287 (405)  |                 |                    |                                           |
|    |       |          |     |          |     |                                                | 155,0500 (427)  |                 |                    |                                           |
|    |       |          |     |          |     |                                                | 115,0542 (351)  |                 |                    |                                           |
| 20 | 12,07 | 255,0652 | 0,1 | 253,0495 | 4,7 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> | -               | 225,0537 (1675) | 276, 408 (br)      | Rubiadine                                 |
|    |       |          |     |          |     |                                                |                 | 209,0619 (424)  |                    |                                           |
|    |       |          |     |          |     |                                                |                 | 181,0658 (101)  |                    |                                           |

### 3. Conclusions sur la composition du colorant

À la suite de l'identification des principales anthraquinones, le chromatogramme UV-visible affichant simultanément les composés qui absorbent à 280, 420 et 500 nm (les principaux  $\lambda_{\text{max}}$  des composés identifiés) a été annoté afin de déterminer les principaux composés responsables de la couleur de l'extrait (Figure II-16).

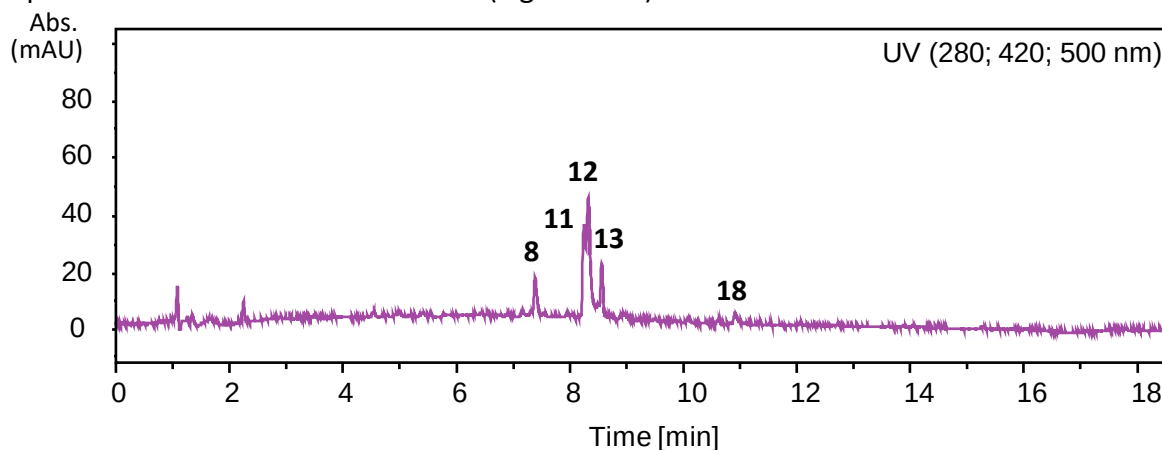


**Figure II-16 :** Chromatogramme UHPLC-DAD correspondant aux absorbances à 280, 420 et 500 nm.

Ces derniers correspondent tous à des anthraquinones, identifiées comme étant la pseudopurpurine (**11**), la munjistine (**12**), des dérivés glycosylés de la lucidine (**8** et **13**) et de la purpurine (**18**) (Figure II-16).

Bien qu'elle soit décrite dans la littérature comme le principal marqueur de la garance des teinturiers [290], l'alizarine ne fait donc pas partie des principaux colorants de l'échantillon de plante que nous avons étudié. Une comparaison entre le standard d'alizarine et l'extrait a cependant permis de confirmer que le composé **17**, identifié comme étant une dihydroxyanthraquinone, élue au même temps de rétention que l'alizarine, ce qui corrobore l'hypothèse d'identification émise. L'extraction d'ion correspondant à ce composé a permis de confirmer que l'intensité du pic est faible, ce qui montre que l'alizarine est présente en petite quantité dans l'extrait.

## VI. Conclusion

Le développement d'une méthode d'extraction assistée par micro-ondes à l'eau a permis d'extraire les anthraquinones glycosylées et non glycosylées de la garance des teinturiers. Un plan d'expériences de type Box-Behnken a été utilisé pour optimiser le rendement d'extraction en un minimum d'essais. L'influence de trois paramètres, la puissance des micro-

## CHAPITRE II

ondes, le nombre de cycles d'extraction et le ratio plante/eau, sur le rendement d'extraction a ainsi été étudiée. Le nombre de cycles d'extraction, ainsi que l'interaction entre la puissance et le ratio plante/eau ont été déterminés comme significatifs par le modèle quadratique obtenu. Les conditions d'extraction, permettant un rendement optimal, déterminées par le plan d'expériences sont 5 cycles de 30 s, 1000 W et 550 mg/20 mL. Cependant, la couleur des extraits, et donc leur richesse en anthraquinones, n'étant pas corrélée à leur rendement d'extraction, une deuxième étape de traitement des données a mené à l'extrait dit optimal qui présente à la fois un bon rendement d'extraction et une couleur intense, obtenu après 1 cycle de 30 s, à 1000 W, avec 100 mg de garance pour 20 mL d'eau. Cet extrait a été comparé à différents extraits obtenus soit par des méthodes d'extraction conventionnelles (extraction sous agitation, soxhlet) avec un solvant hydroalcoolique (éthanol 50%), soit avec des méthodes plus innovantes (UAE, ASE) à l'eau, soit par micro-ondes avec des solvants utilisés conventionnellement pour l'extraction des anthraquinones (eau à pH basique, éthanol 50%). La méthode d'extraction développée s'est avérée plus efficace que toutes les autres méthodes, tout en étant plus rapide (30 secondes seulement) et donc peu coûteuse en énergie.

Les principales familles moléculaires de l'extrait optimal ont été identifiées comme étant les sucres, les anthraquinones et les composés phénoliques. La teneur en anthraquinones, la fraction colorante de l'extrait, a été déterminée à environ 4,5% de l'extrait sec, tandis qu'une concentration en composés phénoliques totaux d'environ 2,2% de l'extrait sec a été mesurée. Enfin, 20 composés ont été identifiés par UHPLC-DAD-HRMS/MS, incluant l'acide chlorogénique, 7 flavonoïdes et 12 anthraquinones. Les composés principalement responsables de la couleur de l'extrait ont été identifiés comme étant la pseudopurpurine, la munjistine et deux dérivés glycosylés de la lucidine.

La méthode d'extraction développée répond à plusieurs principes de l'éco-extraction par l'utilisation d'un solvant vert, l'eau et d'une méthode rapide et peu consommatrice d'énergie, la MAE. Elle pourra être adaptée à l'échelle pilote pour être utilisée par l'entreprise Terre de Couleur afin d'obtenir des ingrédients colorés et riches en composés phénoliques pouvant être incorporés dans des formulations cosmétiques. Les activités antioxydantes et anti-UV de l'extrait optimal, ainsi que son utilisation en formulation seront abordées dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

## Chapitre III

Extraction biphasique (eau/huile  
végétale) simultanée de colorants  
liposolubles et de molécules  
hydrosolubles

### I. Introduction

Comme montré précédemment, l'eau peut être utilisée pour extraire les composés polaires ou moyennement apolaires. En revanche, ce n'est pas un solvant adapté à l'extraction des composés liposolubles, quelle que soit la technique d'extraction utilisée. Il est cependant possible d'ajouter un co-solvant vert afin de diminuer la polarité du solvant global et de permettre l'extraction des molécules apolaires.

Le roucou est une plante tinctoriale originaire d'Amérique du Sud et Centrale. Le colorant rouge-orangé issu de l'arille, la chair qui entoure les graines du roucou, était traditionnellement utilisé, notamment par les Aztèques, comme colorant alimentaire, comme peinture corporelle et comme teinture textile. Aujourd'hui, ce colorant contenant principalement de la bixine, ainsi que d'autres apocaroténoïdes, est devenu l'un des principaux colorants utilisés dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique [330,331].

Au-delà de son pouvoir tinctorial, l'extrait de roucou a été valorisé en cosmétique pour son potentiel anti-UV, ainsi que dans divers produits de soins pour la peau. Il possède en effet différentes activités d'intérêt cosmétique (antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire) dues à sa richesse en apocaroténoïdes, mais aussi en tocotriénols [330,332–334]. De plus, Cardarelli *et al.* ont mis en lumière le rôle des composés phénoliques dans l'activité antioxydante de l'extrait de roucou [335]. Pourtant, ces derniers ont été peu étudiés à ce jour et seuls quelques acides phénoliques, chalcones et flavonoïdes ont été identifiés [336–338]. La graine de roucou est aussi utilisée comme épice dans les régions où il est cultivé, grâce à sa richesse en composés volatils [331]. Ces derniers peuvent avoir un intérêt en cosmétique du fait de leur parfum ou de leur activité antimicrobienne [339].

Afin d'extraire tous ces composés d'intérêt en une seule étape, un solvant biphasique eau/huile végétale a été développé. L'eau et l'huile végétale sont des solvants verts communément utilisés en cosmétique [91]. L'extraction des caroténoïdes dans l'huile végétale peut aussi améliorer leur stabilité face à l'oxydation, comme l'ont montré Kanjilal et Singh pour la bixine [340]. La différence de polarité entre l'eau et l'huile devrait permettre l'extraction des molécules polaires dans l'eau et des molécules apolaires dans l'huile.

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) a été sélectionnée, car elle permet de diminuer la viscosité de l'huile végétale et ainsi d'améliorer la diffusivité et donc l'extraction des composés

## CHAPITRE III

[179,341]. De plus, cette méthode permet d'intensifier l'extraction sans utiliser une température élevée qui pourrait dégrader l'huile ou le colorant [264]. L'UAE, ainsi que les huiles végétales, ont déjà été décrites pour l'extraction des caroténoïdes de diverses sources, dont le roucou. Cependant, la méthode décrite ici est la première extraction du roucou réalisée simultanément dans l'eau et dans l'huile. De plus, les deux phases de l'extrait ont été caractérisées par UHPLC-HRMS/MS, menant notamment à l'identification de tanins hydrolysables qui avaient précédemment été détectés, mais jamais identifiés. Enfin, la fraction volatile a été caractérisée par SPME-GC-MS. L'extrait obtenu a été envisagé comme un ingrédient prêt à formuler riche en colorant, mais aussi en actifs apportés par l'extrait et potentiellement par l'huile végétale.

## II. Le rocouyer (*Bixa orellana* L.)

### A. Description de la plante

Le rocouyer (*Bixa orellana* L.) est un arbuste vivace originaire d'Amérique du Sud qui fait partie de la famille des Bixaceae (Tableau III-1). Il est aussi parfois appelé roucou ou rocou, ces termes pouvant aussi faire référence à son fruit [331,342]. Le nom roucou dérive du mot « ru-ku » qui signifie rouge en tupi, une langue amazonienne [342].

**Tableau III-1 :** Classification du rocouyer selon la classification APG IV.

|                    |                                     |
|--------------------|-------------------------------------|
| Règne              | Plantae                             |
| Sous-embranchement | Angiospermes                        |
| Classe             | Eudicotylédones                     |
| Sous-classe        | Rosidae                             |
| Ordre              | Malvales Juss. ex Bercht. & J.Presl |
| Famille            | Bixaceae K.S. Kunth                 |
| Genre              | <i>Bixa</i> L.                      |
| Espèces            | <i>Bixa orellana</i> L.             |

Le rocouyer peut atteindre 9 m de hauteur [331,342]. Ses feuilles alternes sont ovales, à base cordée et sommet acuminé, avec un bord entier (Figure III-1). Le pétiole, qui peut mesurer jusqu'à 5 cm, est élargi à la base et au sommet [343]. Le rocouyer produit des fleurs roses ou blanches, ainsi que des capsules épineuses à 2 valves contenant 20 à 50 graines recouvertes d'une arille rouge visqueuse dont on peut extraire un colorant rouge-orangé (Figure III-1) [331,343].

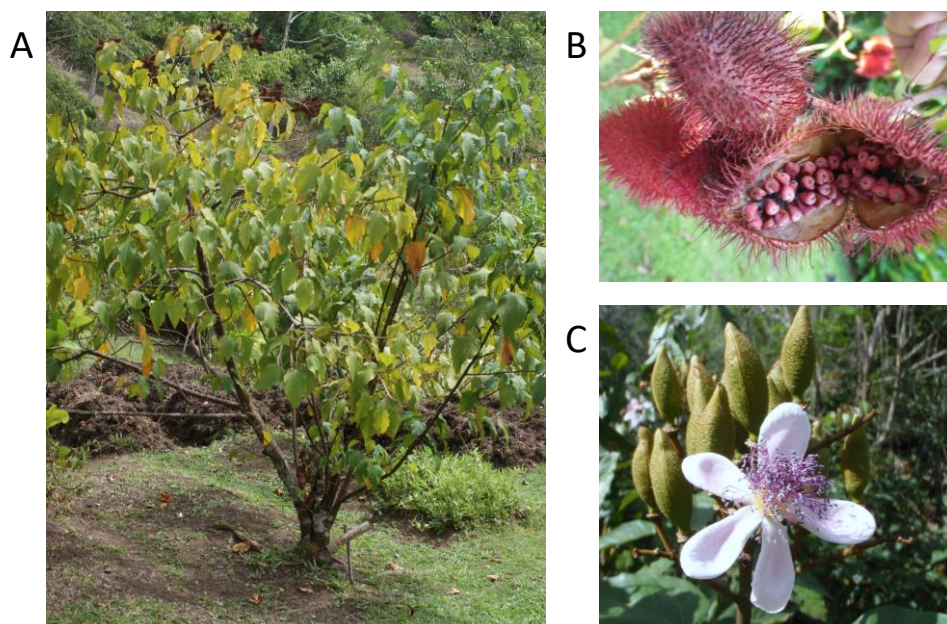


**Figure III-1** : Photographies de *Bixa orellana* présentes sur l'eFlore de Tela botanica [344]. A : arbuste entier, B : capsule mûre et graines, C : Fleur. Auteurs : A et B Liliane Roubaudi et C Geneviève Botti.

### B. Composition générale de la graine de roucou

Les graines et l'arille (enveloppe charnue qui recouvre les graines) du roucou sont utilisées pour obtenir un colorant rouge-orangé appelé annatto [345]. Sa couleur provient de sa richesse en apocaroténoïdes, particulièrement en bixine, mais il contient aussi d'autres molécules d'intérêt non colorées [345].

#### 1. Apocaroténoïdes et autres caroténoïdes

Environ 80% du colorant issu du roucou est composé de bixine [331,345,346]. La graine peut contenir entre 1 et 5% de bixine en fonction du cultivar et des conditions de culture [342,347]. La bixine est naturellement présente sous sa forme 9-*cis*, mais peut s'isomériser en *trans*-bixine, aussi appelée isobixine, sous l'effet de la chaleur (Figure III-2) [331,345]. Une hausse prolongée de la température peut alors mener à la dégradation de la bixine en *m*-xylène et en un produit communément appelé C17 (Figure III-2) [172,348]. La saponification de la bixine permet l'obtention du sel de norbixine, puis de la norbixine après neutralisation du pH (Figure III-2) [172].

Parmi les apocaroténoïdes décrits dans l'annatto, on retrouve donc principalement la bixine et la norbixine, aussi appelée orelline, sous forme *cis* et *trans* (Figure III-2) et la méthyl-bixine (Figure III-3) [331,338,346]. Plusieurs caroténoïdes ont aussi été décrits, tels que le  $\beta$ -carotène, la lutéine, la cryptoxanthine et la zéaxanthine (Figure III-3) [331,346,349].

## CHAPITRE III

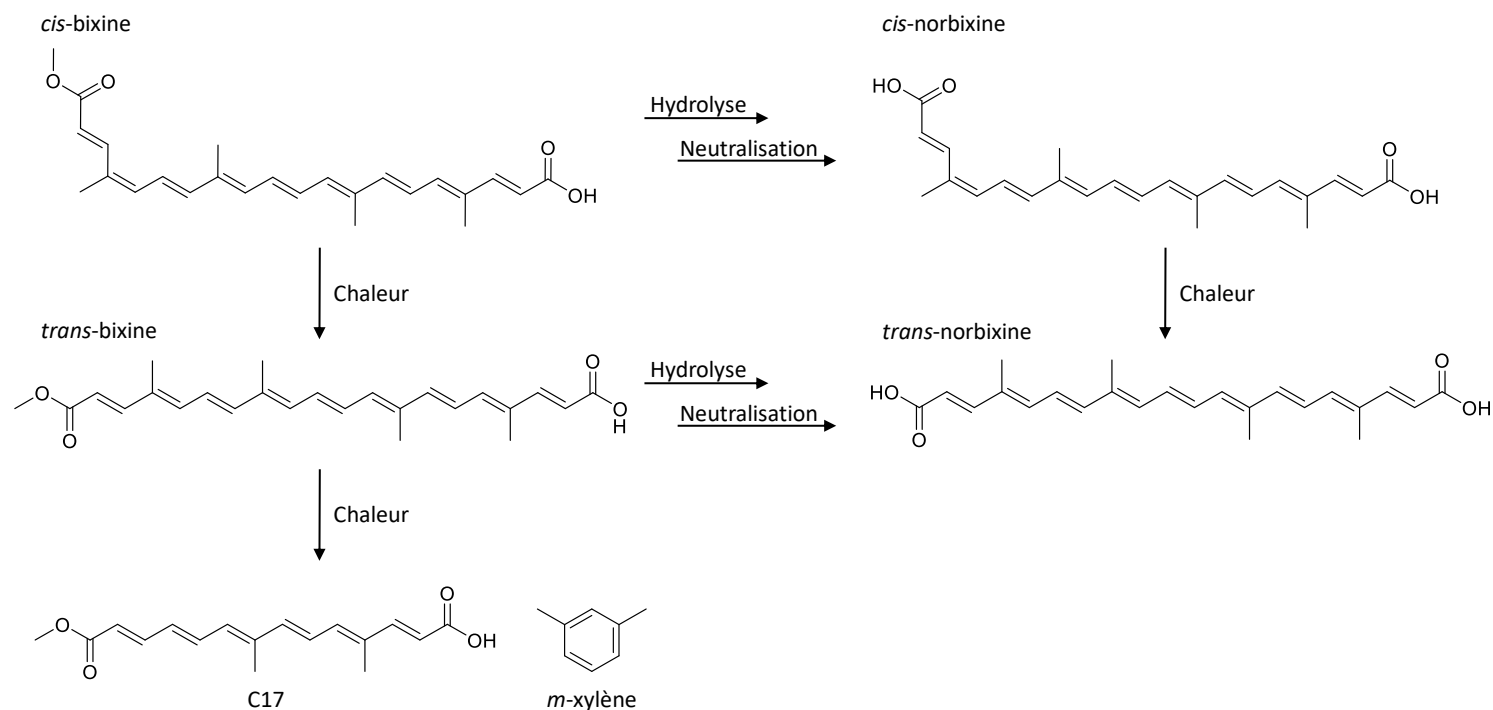


**Figure III-2 :** Voies d'isomérisation et de saponification de la bixine et de la norbixine et de leur dégradation en C17 et *m*-xylène.

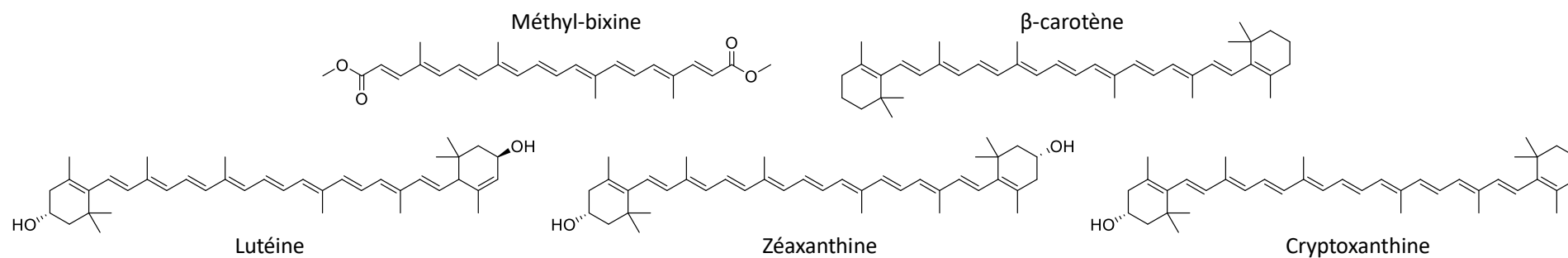


**Figure III-3 :** Structure des principaux caroténoïdes et apocaroténoïdes du roucou autres que bixine et norbixine.

## 2. Autres terpènes et composés volatils

D'après certains auteurs, le roucou est la source végétale la plus riche en terpènes, parmi lesquels on retrouve les caroténoïdes, mais aussi d'autres composés. Le E-géranylgéraniol représente plus de la moitié du contenu en terpènes du roucou et environ 1% de la masse sèche de la graine de roucou [331,342,350].

Le roucou est utilisé pour son colorant, mais aussi pour un usage aromatique en raison de sa richesse en composés volatils. Plus de 100 composés volatils ont été identifiés dans les extraits de roucou, parmi lesquels on retrouve des sesquiterpènes et des monoterpènes [330,342]. Une grande majorité de la fraction volatile du roucou est composée de sesquiterpènes. Galindo-Cuspinera *et al.* ont déterminé qu'ils constituaient 38% des volatils de l'extrait huileux et 89% des volatils de l'extrait aqueux [345]. Les principaux sesquiterpènes décrits dans la littérature sont l' $\alpha$ - et le  $\beta$ -humulène, l' $\alpha$ - et le  $\beta$ -caryophyllène, le (Z,E)-farnésyl-acétate, l'occidentalol acétate, l'ishwarane, ainsi que le  $\delta$ - et le  $\gamma$ -élémane, les germacrène B et D, le spathulénol, le  $\gamma$ -muurolène, le  $\delta$ -cadinène et le copaène [345,351,352]. La fraction volatile du roucou contient aussi plusieurs monoterpènes, particulièrement l' $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -pinène [345,351]. D'autres monoterpènes présents en plus faibles concentrations incluent le camphène, le  $\beta$ -phellandrène, le  $\beta$ -myrcène, le limonène ou le *t*-ocimène [345]. Galindo-Cuspinera *et al.* ont aussi retrouvé une grande quantité de *p*-xylène et de toluène dans l'extrait huileux, qui peuvent correspondre à des produits de dégradation des caroténoïdes [345].

## 3. Tocophérols et tocotriénols

Les 4 principaux stéréoisomères des tocophérols et tocotriénols forment la vitamine E (Figure III-4). La plupart des graines et feuilles de plantes contiennent des tocophérols, mais les tocotriénols sont plus rares [331].

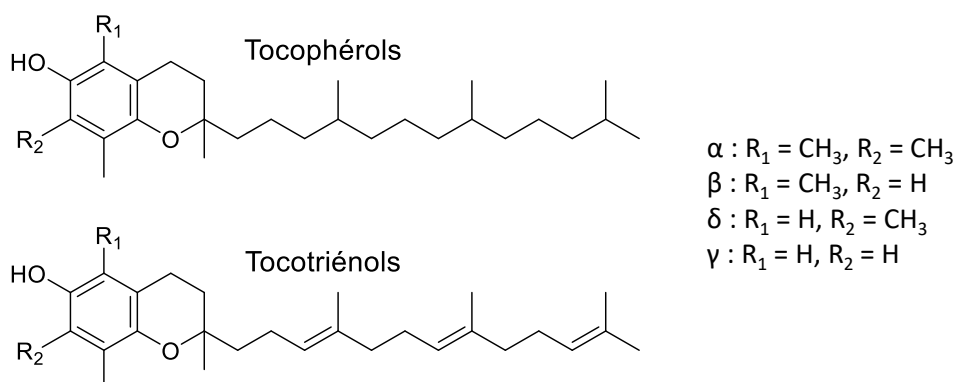


**Figure III-4** : Structures des tocophérols et tocotriénols

## CHAPITRE III

Or, le roucou est cité comme la source végétale la plus riche en tocotriénols avec un ratio tocotriénols/ tocophérols de 99,9/0,1 [331]. Il contient les formes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  des deux familles et principalement du  $\delta$ -tocotriénol [353].

### 4. Composés phénoliques

Les composés phénoliques de la graine de roucou ont été moins étudiés que les composés apolaires. Des acides phénoliques, flavonoïdes et chalcones ont cependant été décrits (Figure III-5). Les acides phénoliques identifiés dans le roucou sont l'acide chlorogénique et un dérivé d'acide caféique [336,337]. Les flavonoïdes décrits dans le roucou sont l'hypolaétine, la naringénine, la catéchine et la chrysine [336–338]. Enfin, les chalcones identifiées dans le roucou sont la butéine, la licochalcone A et le xanthoangéol [337].

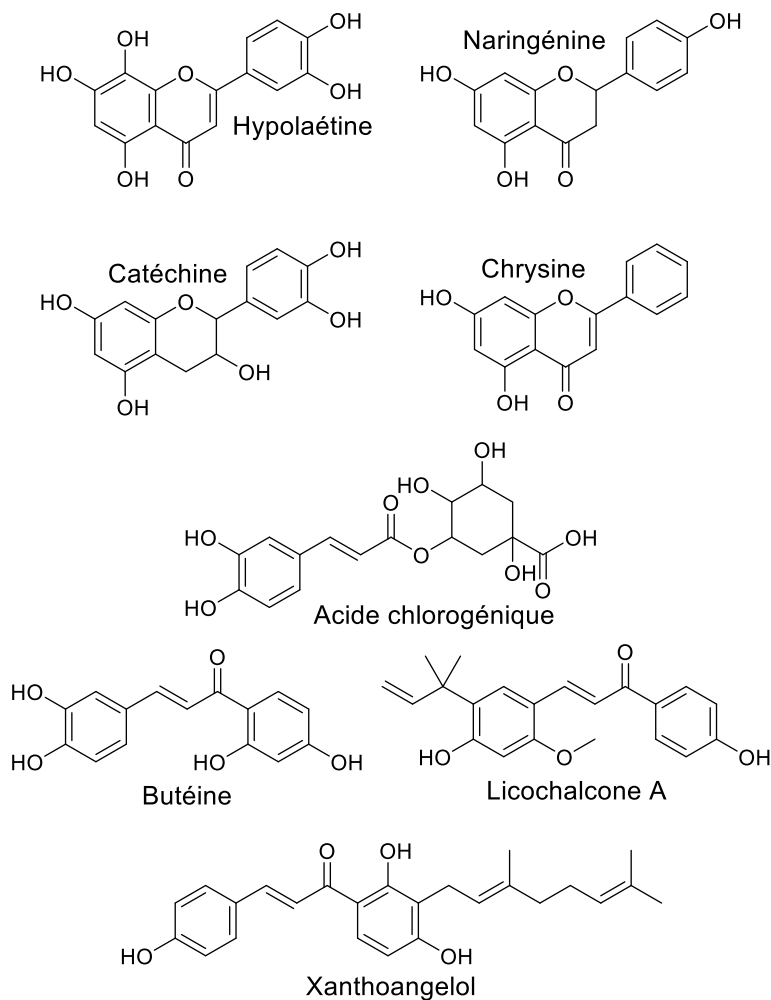


**Figure III-5 :** Structures des composés phénoliques décrits dans le roucou.

### C. Usages en tant que colorant

Le roucou est traditionnellement utilisé comme colorant alimentaire, textile et cosmétique en Amérique du Sud et Centrale, d'où il est originaire [172]. Il est notamment surnommé

## CHAPITRE III

« lipstick tree » en raison de son utilisation comme rouge à lèvres [330,331,346]. Son usage s'est exporté vers l'Europe et l'Amérique du Nord dès les années 1790 [172].

Le roucou est aujourd'hui cultivé dans la plupart des régions tropicales pour son colorant. Il est actuellement l'un des colorants naturels les plus utilisés dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique sous les dénominations E160b (numéro E pour l'usage alimentaire) et CI Natural Orange 4 ou CI 75120 (Color Index) [331,346].

Dans les pays producteurs, la graine de roucou broyée est directement utilisée comme épice ou colorant alimentaire, mais une large majorité de la production de roucou est plutôt exploitée par les pays d'Amérique du Nord et d'Europe sous forme d'extrait [331,345]. Il est alors utilisé comme colorant ou agent aromatisant dans la confection de produits alimentaires comme le beurre, le fromage ou divers desserts, mais aussi de produits cosmétiques comme des vernis à ongles ou des colorations capillaires, ainsi que d'autres produits comme de la peinture, des teintures textiles etc. [331,342,345].

### III. Détermination de la méthode d'extraction

#### A. Méthodes d'extraction décrites du colorant issu du roucou

De manière conventionnelle, le roucou est extrait par macération à l'huile ou à l'eau à pH basique en fonction du type de valorisation de l'extrait [172,330,331]. En effet, le colorant liposoluble contient principalement de la bixine, qui lui donne une couleur rouge, tandis que l'extrait hydrosoluble est plutôt jaune en raison de sa richesse en norbixine [331]. D'autres méthodes d'extraction utilisant différents types de solvants ont aussi été décrites [172,330]. La bixine et la norbixine sont sensibles à la lumière et aux températures supérieures à 70°C [173], bien qu'elles se dégradent moins rapidement que les autres caroténoïdes [330]. Ces deux facteurs doivent donc être contrôlés durant l'extraction.

##### 1. Extraction à l'huile

L'extraction du roucou à l'huile pour une utilisation industrielle est conventionnellement réalisée avec de l'huile de soja, de tournesol ou de raisin [331,354]. L'extrait huileux contient principalement de la *cis*-bixine et sa couleur peut varier entre le jaune et le rouge-orangé [331]. Lorsque l'huile est chauffée pendant l'extraction, la *cis*-bixine est transformée en *trans*-bixine, sa forme la plus stable et la plus soluble. En revanche, l'exposition prolongée à une température élevée peut causer la dégradation de la bixine en C17, un composé jaune

## CHAPITRE III

[172,331,345]. L'extrait huile ne peut pas contenir plus de 1% de bixine pour des raisons de solubilité [331].

Van Chuyen *et al.* ont soumis les graines entières de roucou à un pré-traitement à l'eau alcaline à 50°C pendant 40 min avant une extraction dans l'huile de soja (100°C, 20 min). Ce traitement leur a permis d'améliorer le rendement en bixine, probablement grâce à des changements structuraux apportés par le gonflement des graines dans l'eau [266].

### 2. Extraction à l'eau

L'extraction aqueuse du roucou pour l'industrie est généralement réalisée avec une solution d'hydroxyde de potassium ou de sodium. L'ajout d'acide chlorhydrique permet ensuite de faire précipiter le colorant, qui est récupéré par filtration. L'extrait sec ainsi obtenu peut contenir jusqu'à 15% de norbixine et permet de préparer une solution aqueuse contenant jusqu'à 5% de norbixine [172,331]. La macération dans l'eau à pH basique a aussi été décrite à l'échelle du laboratoire [173,355,356]

Plusieurs méthodes ont été décrites pour l'extraction à l'eau du roucou avec ou sans modification du pH. D'après Rodrigues *et al.*, l'extraction par liquide pressurisé ne permet pas une extraction satisfaisante de la bixine du roucou avec de l'eau [357]. En revanche, les méthodes par micro-ondes décrites semblent efficaces pour l'extraction de la bixine et de la norbixine [219,358].

### 3. Extraction par d'autres types de solvants

Différents solvants ont été décrits dans l'extraction du roucou, incluant l'éthanol [357,359,360], le méthanol [361], les solutions alcooliques d'hydroxyde de sodium, les mélanges hydroalcooliques [337,359,362], le propylène glycol [354], le PEG400 [363], l'acétone [364], l'acétate d'éthyle [365], le chloroforme [366] et le dichlorométhane [367]. Plusieurs études décrivent l'utilisation d'une combinaison de ces solvants, par exemple acétone/méthanol/eau (50/40/10) [336], acétate d'éthyle puis *tert*-butyle méthyle éther [368–370], acétate d'éthyle/eau [371] ou acétate d'éthyle/dichlorométhane [350]. Cardarelli *et al.* ont comparé l'efficacité de plusieurs solvants (éthanol et méthanol 50 et 100%, acétate d'éthyle et hexane) sur l'extraction de la bixine et des composés phénoliques du roucou [335]. L'acétate d'éthyle s'est avéré être le meilleur solvant pour l'extraction de la bixine, suivi par le méthanol et l'éthanol, tandis que pour les composés phénoliques, les mélanges hydroalcooliques et le méthanol pur étaient plus efficaces [335]. Jayakumar *et al.* ont tiré une

## CHAPITRE III

conclusion similaire après la comparaison de l'acétate d'éthyle, du méthanol et de l'éthanol. D'après eux, l'acétate d'éthyle est le plus efficace pour l'extraction de la bixine, tandis que le méthanol permet d'extraire à la fois les composés phénoliques et la bixine [372].

Parmi les méthodes décrites, on retrouve l'extraction sous chauffage et agitation [336,361,365], la percolation [365], le soxhlet [360,364], l'extraction assistée par ultrasons (UAE) [337,357,363,365,366] ou par micro-ondes (MAE)[362,365,371], l'extraction sous pression [357,359] et l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique [359,373–378]. Bachtler et Bart ont comparé l'efficacité de la macération, de la percolation, de l'UAE et de la MAE pour l'extraction de la bixine dans l'acétate d'éthyle [365]. L'UAE et la MAE ont permis d'obtenir un meilleur rendement en bixine que les méthodes conventionnelles, la MAE étant légèrement plus efficace que l'UAE. Les conditions d'extraction optimales décrites sont 650 mg de plante pour 20 mL de solvant, à 80 W et 45°C [365].

### **B. Choix de l'huile végétale**

Dans le cadre de cette thèse, le solvant d'extraction privilégié est l'eau. Cependant, l'extraction à l'eau seule ne permettra pas d'extraire tous les composés d'intérêt. La combinaison de l'eau avec un autre solvant permettra d'accéder à une plus vaste gamme de composés et donc, dans le cas du roucou, de réaliser l'extraction simultanée de toutes les familles de molécules d'intérêt (composés phénoliques, caroténoïdes, terpènes volatils). Nous avons privilégié l'huile végétale, un solvant vert qui constitue, avec l'eau, la base des phases aqueuse et grasse des émulsions utilisées pour dans la plupart des produits cosmétiques. L'extrait final pourra donc être incorporé directement dans une formule cosmétique voire directement émulsifié pour obtenir le produit final.

#### **1. Les huiles végétales comme solvant d'extraction**

La macération de végétaux dans les huiles végétales est utilisée depuis plusieurs millénaires sur tous les continents afin d'enrichir l'huile en actifs, colorants et arômes [264]. Les huiles végétales sont des solvants verts biosourcés. Leur efficacité pour extraire différents composés, notamment les caroténoïdes, a déjà été démontrée [264,379]. Elles ont en effet le double avantage d'être capable de solubiliser, mais aussi de stabiliser les caroténoïdes [379]. De plus, pour une valorisation cosmétique, l'huile est un solvant, mais aussi un actif notamment émollient et antioxydant [65] qui peut être conservé dans le produit final. Ainsi,

## CHAPITRE III

l'utilisation d'huile végétale lors de l'extraction permet d'éviter le coût et l'impact environnemental de l'étape d'évaporation que nécessiterait un autre solvant [264,379].

La principale difficulté liée à l'utilisation des huiles végétales comme solvant d'extraction est leur viscosité élevée. En effet, celle-ci peut limiter la diffusivité des composés et donc l'efficacité de l'extraction [379]. Les huiles végétales ont été utilisées comme solvants avec plusieurs méthodes d'éco-extraction, notamment l'UAE et la MAE et comme co-solvant dans l'extraction par fluide supercritique [264]. L'UAE permet l'utilisation d'un solvant eau/huile, la diminution de la viscosité du solvant et l'amélioration de l'efficacité d'extraction sans recourir à des températures élevées qui pourraient dégrader l'huile ou l'extrait. Il faut cependant rester vigilant face à la formation de radicaux libres pouvant être engendrée par les ultrasons [379–381].

### 2. Sélection des huiles végétales à étudier

La capacité d'extraction des huiles végétales dépend de différents facteurs comme leur viscosité ou leur composition qui influe sur leur polarité [264,380]. Les huiles végétales sont des milieux complexes, contenant majoritairement des triglycérides (95-98%) [264]. Ces derniers sont composés d'un glycérol estérifié par trois acides gras. La longueur de chaîne et le nombre d'insaturations des acides gras impactent les propriétés physico-chimiques de l'huile [264]. Les huiles végétales peuvent aussi contenir des phospholipides, composés d'un glycérol portant deux acides gras et un groupement phosphate, ainsi que des mono- et diglycérides. Ces molécules, moins apolaires possèdent des propriétés amphiphiles qui peuvent influencer l'extraction notamment par la formation de micelles inverses. Les micelles inverses sont des agrégats de molécules amphiphiles dans lesquels la tête polaire des molécules est orientée vers le centre et la tête apolaire vers l'extérieur, formant une poche polaire au sein de l'huile qui peut accueillir des molécules polaire comme l'eau ou les composés phénoliques [264]. Enfin, d'autres composés minoritaires peuvent être retrouvés dans les huiles vierges, mais sont généralement éliminés lors du raffinage de l'huile [264]. C'est notamment le cas des stérols, tocophérols et tocotriénols, mais aussi des caroténoïdes et des composés phénoliques. La présence de tels composés peut aussi avoir un impact sur l'extraction [264,382,383].

Plusieurs huiles végétales pouvant être utilisées en cosmétiques ont été sélectionnées et comparées afin d'étudier leur impact sur l'extraction des composés cibles dans la phase huile,

## CHAPITRE III

mais aussi dans la phase eau. Les huiles végétales utilisées par l'entreprise partenaire Terre de Couleur ont d'abord été sélectionnées (Annexe 1). Il s'agit de l'huile de tournesol (raffinée), de l'huile de coprah (raffinée), appelée par la suite huile de coco et de l'huile de jojoba (vierge). L'huile de pépins de raisin (raffinée) et l'huile d'olive (vierge) ont ensuite été ajoutées à la sélection (Annexe 1).

Ces huiles ont été choisies afin d'étudier une certaine variété de composition afin d'évaluer si celle-ci a un impact sur l'extraction et de pouvoir émettre des hypothèses pour expliquer les éventuelles différences observées. D'après la littérature, l'huile de jojoba est une cire liquide apolaire principalement composée d'esters d'acides gras et d'alcools gras à longue chaîne (C14-24). Parmi ses composants minoritaires, on retrouve des stérols, ainsi que des composés phénoliques, principalement des flavonoïdes [384,385]. L'huile de coco est particulièrement riche en acides gras saturés à chaîne moyenne (C8-C12) [386], tandis que les huiles de tournesol, raisin et olive contiennent plutôt des acides gras insaturés à chaîne longue avec des ratios différents [382]. L'huile d'olive vierge contient aussi des composants minoritaires tels que des composés phénoliques ou des tocophérols [387]. La première étape de cette étude a donc été d'analyser la composition, ainsi que plusieurs paramètres physico-chimiques de ces huiles végétales

### C. Analyse de la composition des huiles

#### 1. Analyse SFC-MS des acides gras

Une analyse par chromatographie par fluides supercritiques a été réalisée sur chaque huile végétale présélectionnée afin de confirmer leur composition. L'analyse a été réalisée selon une méthodologie développée précédemment au laboratoire avec laquelle de nombreuses huiles végétales ont précédemment été analysées, notamment l'huile d'olive vierge et l'huile de tournesol (méthode en Annexe 9) [388–390].

Les mono-, di- et triglycérides ont été détectés en mode positif sous la forme  $[M+H]^+$  (Figure III-6). L'identification a été réalisée à partir du  $m/z$  de l'ion moléculaire et des pertes neutres correspondant à la perte d'un acide gras observée lors de la fragmentation en source de chaque composé. Les hypothèses d'identification décrites ici ne tiennent donc pas compte de la position des acides gras sur le glycérol et ne différencie pas les régio-isomères (par exemple PLL et LPL).

## CHAPITRE III

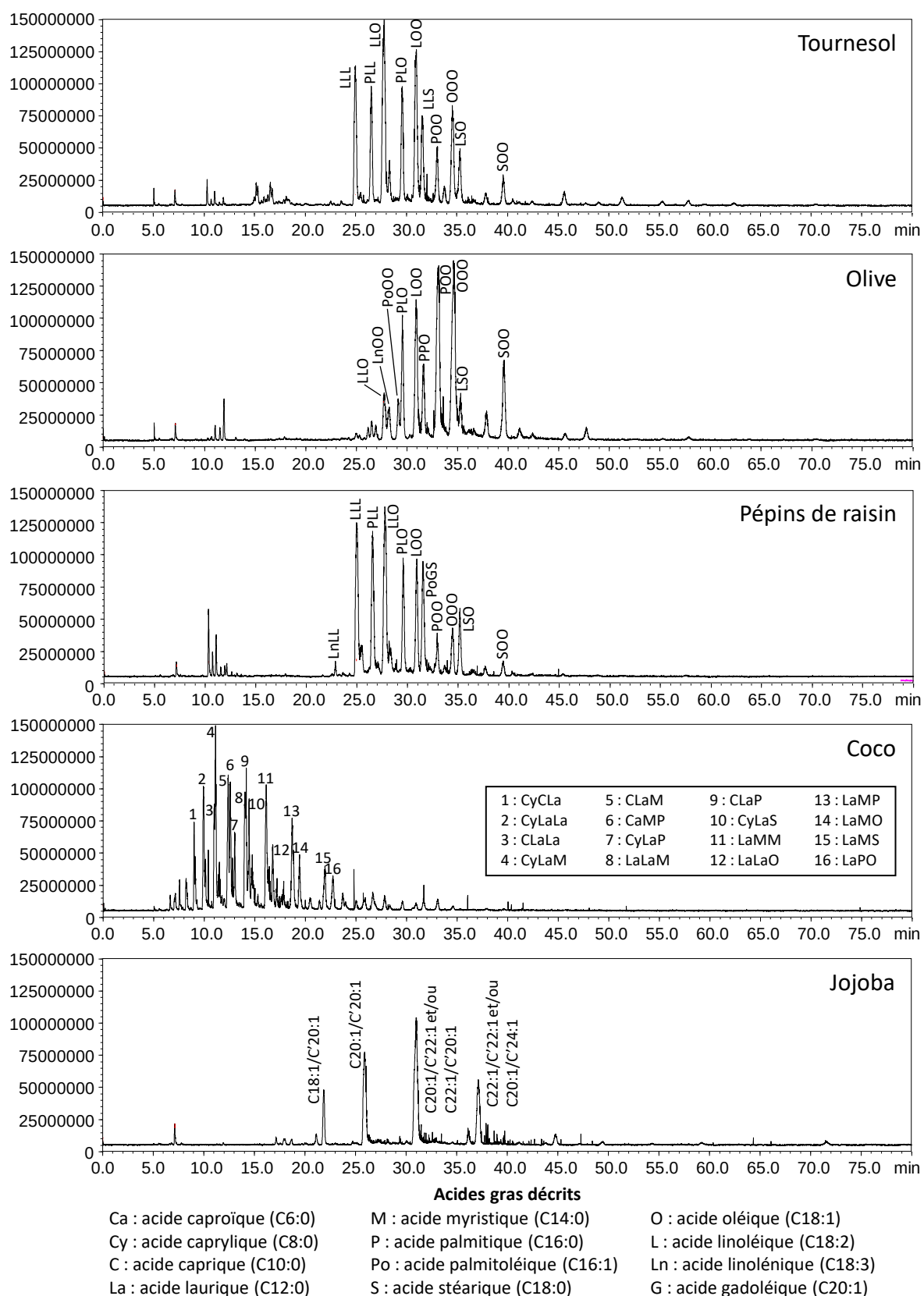


**Figure III-6 :** Chromatogrammes des 5 huiles végétales étudiées, obtenus en SFC-MS (TIC) et annotations des hypothèses d'identification des principaux triglycérides.

## CHAPITRE III

Les hypothèses d'identification s'appuient sur la littérature et sur les résultats précédemment publiés par le laboratoire. Suite à l'identification, la composition des triglycérides de chaque huile, ainsi que leurs nombres de carbones équivalents (ECN) ont été résumés dans le tableau. L'ECN permet de prédire l'ordre d'élution des triglycérides, qui est directement lié à leur polarité. Il dépend à la fois du nombre d'atomes de carbone (CN) et de doubles liaisons ( $n$ ) et est calculé selon l'équation :  $ECN = CN - 2n$ . D'après cette égalité, les triglycérides composés d'acides gras poly-insaturés à chaîne courte sont élués plus tôt et sont donc plus polaires que ceux composés d'acides gras insaturés à chaîne longue.

Le profil chromatographique des huiles de tournesol, raisin et olive sont relativement proches (Figure III-6). En effet, ces trois huiles sont principalement composées d'acides gras à chaîne longue (C14-C24) (Tableau III-2). L'huile de coco est aussi principalement composée de triglycérides, mais ceux-ci sont principalement composés d'acides gras à chaîne moyenne (C8-C12) (Figure III-6). De part cette différence, le massif correspondant aux triglycérides de l'huile de coco est élué à partir de 8 min, soit plus tôt que les massifs de triglycérides des huiles de tournesol, raisin et olive, qui débutent à 23 min (Figure III-6).

**Tableau III-2** : Résumé de la composition des huiles végétales déterminée par SFC-MS et ECN des triglycérides détectés.

|                                      | Tournesol | Raisin | Olive | Coco  | Jojoba |
|--------------------------------------|-----------|--------|-------|-------|--------|
| Esters                               | 0,0%      | 0,0%   | 0,0%  | 0,0%  | 99,2%  |
| Monoglycérides                       | 0,3%      | 0,4%   | 0,4%  | 0,4%  | 0,8%   |
| Diglycérides                         | 1,1%      | 4,2%   | 1,8%  | 1,5%  | 0,0%   |
| Triglycérides                        | 98,6%     | 95,3%  | 97,9% | 98,4% | 0,0%   |
| <b>Composition des triglycérides</b> |           |        |       |       |        |
| AG saturés                           | 0,0%      | 0,0%   | 0,0%  | 83,3% | -      |
| AG saturés et monoinsaturés          | 15,5%     | 7,3%   | 70,7% | 13,2% | -      |
| ≥1 AG polyinsaturé                   | 84,5%     | 92,7%  | 29,3% | 3,0%  | -      |
| <b>ECN des triglycérides</b>         |           |        |       |       |        |
| 28-38                                | -         | -      | -     | 62,5% | -      |
| 40-48                                | -         | -      | -     | 35,4% | -      |
| 50                                   | -         | -      | 4,9%  | 0,9%  | -      |
| 52-54                                | 100,0%    | 96,4%  | 93,2% | 1,2%  | -      |

L'huile de tournesol contient principalement les acides oléique (O, C18:1) et linoléique (L, C18:2), tandis que l'huile d'olive contient majoritairement les acides oléique et palmitique (P, C16:0) et l'huile de pépins de raisin les acides oléique, linoléique et palmitique. L'huile de tournesol et l'huile de pépins de raisin ont un profil proche, avec pour principaux triglycérides

## CHAPITRE III

LLO et LLL, comme décrit dans la littérature [391]. Cependant, les différences de proportions mènent à une plus grande quantité de triglycérides contenant des acides gras polyinsaturés dans l'huile de pépins de raisin (Tableau III-2). Le profil obtenu pour l'huile d'olive correspond à la littérature, les principaux triglycérides identifiés étant OOO, POO et LOO [387,391]. D'après l'analyse SFC-MS, les huiles de tournesol et de pépins de raisin ne contiennent donc que des triglycérides avec un ECN de 52 ou 54, tandis que l'huile d'olive contient aussi quelques triglycérides d'ECN 50 ( $\approx 5\%$ ) et 56 ( $\approx 2\%$ ) (Tableau III-2).

Les principaux acides gras identifiés dans les triglycérides de l'huile de noix de coco sont l'acide laurique (La, C12:0), et l'acide caprylique (Ca, C8:0), des acides gras saturés à chaîne moyenne (C8-C12) et l'acide myristique (M, C14:0), ce qui correspond à la littérature [386]. Elle contient donc une majorité de triglycérides avec un ECN inférieur à 40 (Tableau III-2).

Quant à l'huile de jojoba, son profil chromatographique est différent de ceux des autres huiles, puisqu'il montre la présence de quatre composés majoritaires (Figure III-6). En effet, l'huile de jojoba est une cire liquide principalement composée d'esters d'acides gras à longue chaîne. Les composés majoritaires détectés en SFC-MS sont l'eicosényl oléate (C18:1/C'20:1), l'eicosényl eicosénoate (C20:1/C'20:1), le docosényl eicosénoate (C20:1/C'22:1) et/ou l'eicosényl docosénoate (C22:1/C'20:1) et le docosényl docosénoate (C22:1/C'22:1) et/ou le tétracosényl eicosénoate (C20:1/C'24:1) (Figure III-6). Ces hypothèses d'identification sont corroborées par la littérature [384]. Ces quatre composés sont élués relativement tard en raison de leurs longues chaînes, à 22,0 min, 26,0 min, 31,0 min et 37,2 min (Figure III-6).

D'après ces résultats, l'huile de coco, qui possède les triglycérides aux ECN les plus faibles, est la plus polaire, tandis que l'huile de jojoba, dont les quatre composés majoritaires sont élués tardivement, est la plus apolaire.

### 2. Analyses physico-chimiques des huiles

Plusieurs propriétés physico-chimiques des 5 huiles ont été étudiées. La densité des huiles n'est pas décrite comme ayant un impact sur l'extraction. Cependant, elle a été utilisée pour calculer la masse exacte correspondant au volume à prélever pour l'extraction (méthode en Annexe 10). Elle a été mesurée à 20°C pour toutes les huiles excepté l'huile de coco qui est solide à 20°C. Pour cette dernière, la mesure a donc été réalisée à 30°C. Ces températures correspondent aux températures approximatives auxquelles les huiles ont été pesées lors de la préparation des solvants.

### CHAPITRE III

L'huile de jojoba est la moins dense des huiles sélectionnées, avec une densité de 0,87. Les huiles d'olive et de coco ont une densité de 0,91 et l'huile de tournesol et de raisin ont une densité de 0,92 et 0,93 respectivement (Tableau III-3). Ces mesures correspondent aux valeurs décrites dans les dossiers techniques et réglementaires des huiles fournies par Terre de Couleur, ainsi qu'aux valeurs indiquées dans les rapports du Codex Alimentarius de la Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [392–396].

**Tableau III-3 : Paramètres physico-chimiques mesurés pour chaque huile**

|           | Densité* | Viscosité (mPA.s)** | Tension interfaciale eau/huile (mN/m)** |
|-----------|----------|---------------------|-----------------------------------------|
| Tournesol | 0,921    | 50,2                | 18,6 ± 0,1                              |
| Coco      | 0,914    | 40,8                | 12,5 ± 0,1                              |
| Jojoba    | 0,865    | 32,8                | 24,6 ± 0,3                              |
| Olive     | 0,912    | 54,5                | 17,6 ± 0,1                              |
| Raisin    | 0,926    | 43,9                | 22,2 ± 0,2                              |

\* Mesure réalisée à 30°C pour l'huile de coco et à 20°C pour les autres

\*\* Mesure réalisée à 30°C pour toutes les huiles

La viscosité et la tension interfaciale entre l'huile et l'eau peuvent impacter l'extraction. Ces deux paramètres ont été mesurés à 30°C sur toutes les huiles afin de pouvoir comparer les résultats entre eux (méthodes détaillées en Annexe 10). Une viscosité élevée influence négativement la pénétration du solvant dans la matrice végétale et la diffusivité des composés ciblés dans le solvant d'extraction [380,382]. L'huile de jojoba est la moins visqueuse des huiles sélectionnées à 32,8 mPa.s., tandis que l'huile d'olive est la plus visqueuse à 54,5 mPa.s, suivie par l'huile de tournesol à 50,2 mPa.s. L'huile de coco et le raisin sont intermédiaires, avec une viscosité de 40,8 et 43,9 mPa.s (Tableau III-3). La tension interfaciale entre l'huile et l'eau peut être utilisée pour comparer la polarité des huiles entre elles. En effet, plus la polarité d'une huile est élevée, plus sa tension interfaciale avec l'eau est faible [397]. La tension interfaciale la plus faible parmi les 5 huiles sélectionnées correspond à l'huile de coco (12,5 ± 0,1 mN/m), tandis que la plus élevée est celle de l'huile de jojoba (24,6 ± 0,3 mN/m). Les huiles d'olive (17,6 ± 0,1 mN/m), de tournesol (18,6 ± 0,1 mN/m) et de pépins de raisin (22,2 ± 0,2 mN/m) sont intermédiaires (Tableau III-3). Ces résultats concordent avec les résultats de SFC et permettent de classer les huiles dans l'ordre croissant de leur polarité : jojoba, pépins de raisin, tournesol, olive et coco.

### IV. Optimisation de l'extraction

#### A. Optimisation de l'extraction assistée par ultrason

Afin de développer l'extraction simultanée des composés polaires (composés phénoliques) et non polaires (bixine, tocols etc.) par un solvant biphasique eau/huile, nous avons sélectionné l'extraction assistée par ultrasons. Celle-ci est une méthode d'éco-extraction qui peut être utilisée à des températures relativement faibles [264] et qui permet l'intensification de l'extraction dans les deux phases grâce au phénomène de cavitation. En effet, les ultrasons permettent de diminuer la viscosité de l'huile végétale et donc améliorer l'extraction dans la phase huile, mais aussi de dégrader les parois cellulaires et ainsi de faciliter la diffusion des molécules de la plante vers le solvant. Enfin, les ultrasons vont diminuer la tension de surface entre les deux phases et ainsi faciliter les échanges à l'interface entre l'eau et l'huile, ce qui permettra de faciliter l'extraction, mais aussi, dans un second temps, de former une émulsion [341]. Cette qualité sera mise à profit pour développer un procédé d'extraction-émulsification en une étape menant directement à un produit fini qui sera décrit dans un chapitre ultérieur. L'optimisation de l'extraction assistée par ultrasons a été réalisée avec un solvant eau/huile de tournesol.

##### 1. Sélection des paramètres à optimiser

Plusieurs paramètres ont été étudiés lors de l'optimisation de l'extraction des pigments et actifs du roucou. Certains paramètres dépendent directement du réacteur à ultrason utilisé. En effet, deux paramètres peuvent être réglés sur l'appareil utilisé : le temps d'extraction et la fréquence des ultrasons. En l'absence de thermostat, ces deux paramètres influent sur la température : plus le temps d'extraction et la fréquence des ultrasons sont élevés, plus la température augmente. A 5 kHz (10% du réglage maximal), la température n'a pas augmenté, même après 60 min, tandis qu'à 22,5 kHz (fréquence maximale), la température a augmenté jusqu'à 65°C après 35 min d'extraction et 80°C après 60 min. Afin d'être en mesure d'étudier l'entièreté de la gamme de fréquence sans causer de dégradation des composés potentiellement thermolabiles de l'extrait et de l'huile végétale, le temps d'extraction a été limité à 60 min.

## CHAPITRE III

Un autre paramètre qui a été étudié est le type de récipient utilisé pour l'extraction. Afin de limiter le nombre d'étapes entre l'extraction et l'analyse des extraits, l'extraction a directement été conduite dans des tubes à centrifuger. Deux tailles de tubes ont été comparées (15 mL et 50 mL) en utilisant les mêmes ratios de plante, d'eau et d'huile. La couleur de la phase huile obtenue dans le tube de 50 mL est plus intense que celle de la phase huile obtenue dans le tube de 15 mL (Figure III-7). Les tubes de 50 mL étant plus larges, ils permettent d'augmenter la surface de contact entre les deux phases de solvant et ainsi de faciliter les échanges lors de l'extraction.



**Figure III-7** : Photographie des phases huile obtenues dans le tube à centrifuger de 15 mL (à gauche) et de 50 mL (à droite).

Les volumes d'eau et d'huile ont été fixés à 10 mL afin d'éviter de favoriser la saturation de l'un des deux solvants. La masse de plante extraite a été étudiée entre 0,1 et 1 g/ 20 mL afin de faciliter les échanges entre la plante et les deux solvants. De plus, le ratio eau/huile et la gamme de masse de plante étudiée ont été choisis en prévision de l'étape suivante du projet : le développement d'une méthode combinant extraction et formulation. En effet, la quantité finale d'eau et d'huile seront alors définies par la formulation choisie et il sera nécessaire de limiter la quantité de particules dans le produit final.

### 2. Plan d'expériences

Un plan d'expériences de type Box-Behnken a été utilisé afin d'optimiser le temps d'extraction (10-60 min), la fréquence des ultrasons (5-22,5 KHz, soit 10-100% de la fréquence réglable) et le ratio plante/solvant (0,1-1 g/20 mL) (Tableau III-4). La matrice de plan d'expériences a été construite sur le logiciel StatEase. En raison de la durée de chaque extraction, le plan a été réalisé en trois blocs, contenant chacun deux points centraux (35 min, 13,75 kHz, 0,55 g/20 mL), chaque bloc correspondant à une journée. Les réponses choisies pour le plan d'expériences sont l'absorbance à 465 nm pour la phase huile, et la teneur en composés phénoliques totaux, mesurée par le test de Folin-Ciocalteu pour la phase eau. Ces réponses

## CHAPITRE III

permettent de comparer la teneur en composés d'intérêt dans chaque phase. Toutes les analyses ont été réalisées le jour même de l'extraction ou le lendemain afin de limiter la dégradation éventuelle des composés entre l'extraction et l'analyse.

**Tableau III-4 :** Facteurs et niveaux utilisés dans le plan d'expériences.

| Facteurs                       | Niveaux |       |      |
|--------------------------------|---------|-------|------|
|                                | -1      | 0     | +1   |
| Temps d'extraction (min)       | 10      | 35    | 60   |
| Fréquence (kHz)                | 5       | 13,75 | 22,5 |
| Ratio plante/solvant (g/20 mL) | 0,1     | 0,55  | 1    |

Le plan d'expériences n'a permis d'obtenir qu'un modèle linéaire pour la réponse de l'absorbance de l'huile à 465 nm. En effet, aucun autre modèle significatif n'a pu être obtenu quelles que soient les combinaisons de facteurs incluses ou la réponse étudiée. De plus, le modèle linéaire obtenu possède un coefficient de régression faible ( $R^2 = 77,7\%$  et  $R^2_{\text{ajusté}} = 72,5\%$ ), ce qui indique une mauvaise corrélation entre les résultats prédits et les résultats observés. La valeur prédictive du modèle obtenu s'est effectivement montrée insuffisante. Par exemple, l'extrait ayant la plus haute valeur d'absorbance expérimentale ( $2,32 \pm 0,23$  u.a.) a été obtenu en 35 min, à 22,5 kHz, avec 1 g de plante pour 20 mL de solvant. Or, la valeur prédite par le modèle pour cet extrait est de 1,8 u.a. et les conditions optimales selon le modèle sont 60 min, 22,5 kHz, 1 g/20 mL.

Ces résultats, ainsi que l'absence de modèle satisfaisant pour la réponse du dosage des phénoliques totaux dans la phase eau ont conduit à l'utilisation directe des résultats expérimentaux plutôt que les prédictions du plan d'expériences pour déterminer les conditions d'extraction les plus efficaces.

### 3. Détermination de l'extrait optimal

Le plan d'expériences n'a pas permis de déterminer les conditions d'extraction optimales, c'est pourquoi les résultats expérimentaux obtenus ont été directement utilisés pour déterminer l'extrait le plus performant parmi les conditions testées. L'absorbance à 465 nm des extraits après une dilution par 10 dans l'huile de tournesol s'étend entre 0,22 et 2,32 u.a. (Tableau III-5). Les points centraux ont une absorbance moyenne de  $1,11 \pm 0,28$  u.a., ce qui montre une variabilité acceptable malgré la viscosité de l'huile. Concernant la phase eau, la teneur en composés phénoliques totaux va de 0,02 à 0,22 mg d'équivalent acide gallique/mL

## CHAPITRE III

(Tableau III-5). Les points centraux contiennent en moyenne  $0,14 \pm 0,02$  mg eq. AG/mL, montrant encore une fois une variabilité acceptable entre les extraits.

**Tableau III-5 :** Conditions d'extraction et résultats des analyses réalisées sur les extraits du plan d'expériences.

| n° | Temps (min) | Fréquence (KHz) | Ratio plante/solvant (g/20 mL) | Absorbance à 465 nm (u.a.) | Phénols totaux (mg GA eq./mL) |
|----|-------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 1  | 35          | 5               | 1                              | $0,54 \pm 0,06^b$          | $0,14 \pm 0,01^c$             |
| 2  | 60          | 13,75           | 0,1                            | $0,89 \pm 0,05^{cd}$       | $0,03 \pm 0,00^a$             |
| 3  | 10          | 5               | 0,55                           | $0,66 \pm 0,07^{bc}$       | $0,06 \pm 0,01^{ab}$          |
| 5  | 35          | 22,5            | 1                              | $2,32 \pm 0,23^h$          | $0,20 \pm 0,01^d$             |
| 7  | 35          | 22,5            | 0,1                            | $1,19 \pm 0,07^{ef}$       | $0,03 \pm 0,00^a$             |
| 8  | 60          | 13,75           | 1                              | $1,32 \pm 0,07^f$          | $0,12 \pm 0,00^{bc}$          |
| 10 | 10          | 22,5            | 0,55                           | $0,94 \pm 0,07^{de}$       | $0,15 \pm 0,01^{cd}$          |
| 12 | 35          | 5               | 0,1                            | $0,22 \pm 0,04^a$          | $0,03 \pm 0,00^a$             |
| 13 | 10          | 13,75           | 0,1                            | $0,43 \pm 0,03^{ab}$       | $0,14 \pm 0,00^c$             |
| 14 | 60          | 22,5            | 0,55                           | $1,97 \pm 0,12^g$          | $0,14 \pm 0,00^c$             |
| 15 | 10          | 13,75           | 1                              | $0,62 \pm 0,06^b$          | $0,06 \pm 0,00^{bc}$          |
| 16 | 60          | 5               | 0,55                           | $0,53 \pm 0,08^b$          | $0,07 \pm 0,00^{ab}$          |
| PC | 35          | 13,75           | 0,55                           | $1,11 \pm 0,28^{ef}$       | $0,14 \pm 0,02^c$             |

PC : points centraux, n = 6 extraits indépendants (n° 4, 6, 9, 11, 17 et 18)

Absorbance : n = 5 analyses par extrait

Folin : dosage des composés phénoliques totaux, n = 3 analyses par extrait

<sup>a-h</sup> : les lettres différentes désignent des extraits significativement différents d'après l'analyse de variance

Pour les deux réponses, l'extrait optimal est l'extrait n°5, obtenu après 35 min d'extraction à 22,5 KHz, avec 1 g de roucou. Le ratio plante/solvant le plus élevé a permis d'obtenir les meilleurs résultats, indiquant qu'aucun des deux solvants n'a été saturé. La fréquence maximale du réacteur (22,5 kHz) est proche de la fréquence de 20 kHz, décrite comme la plus efficace et la plus communément utilisée pour l'extraction végétale [180].

## B. Optimisation du solvant

### 1. Comparaison de l'extraction du colorant par les différentes huiles

L'impact de l'huile sur l'extraction a été déterminé en réalisant l'extraction dans les conditions optimisées en triplicats avec chacune des 5 huiles sélectionnées précédemment (tournesol, olive, pépins de raisin, coco et jojoba). Pour déterminer la capacité d'extraction du colorant par les différentes huiles, les spectres d'absorbance dans le visible ont été comparés. Contrairement aux résultats présentés précédemment, les extraits ont été dilués dans l'heptane plutôt que dans l'huile d'extraction. Ce choix a été fait en raison de l'état solide de

### CHAPITRE III

l'huile de coco pure à température ambiante, mais aussi pour diminuer la variabilité des résultats liée à la viscosité des huiles.

Les spectres d'absorption dans le domaine du visible ont le même profil quelle que soit l'huile, mais une forte différence d'intensité peut être observée (Figure III-8). Les extraits obtenus par l'huile de tournesol ont une absorbance plus élevée que les autres, tandis que l'absorbance des extraits obtenus avec l'huile de jojoba est bien plus faible (Figure III-8).

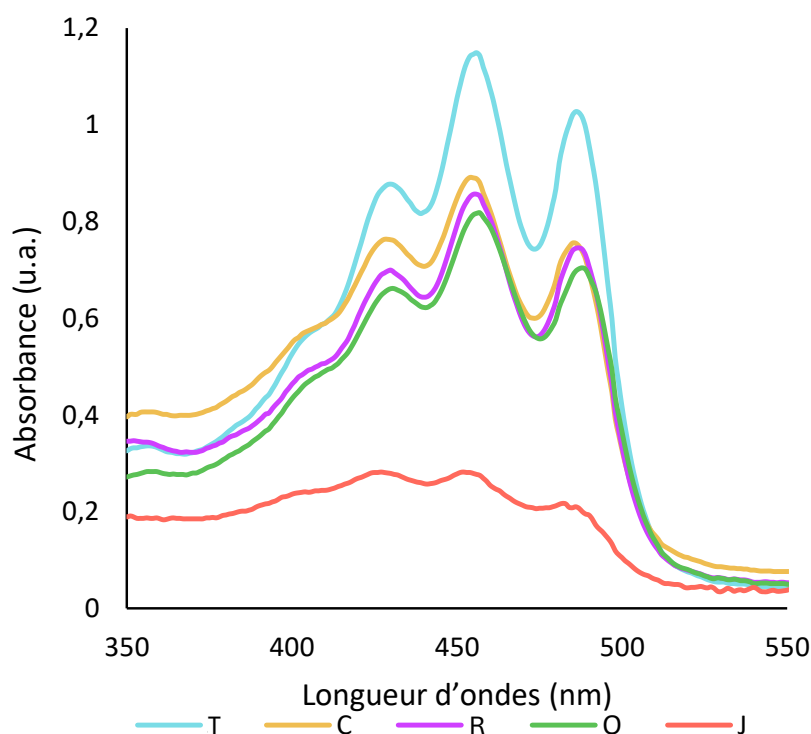


**Figure III-8 :** Spectre d'absorption dans le visible (350-550 nm) des phases huile après une dilution par 10 dans l'heptane. T : tournesol, C : coco, R : raisin, O : olive, J : jojoba.

D'après la littérature, l'extraction des caroténoïdes dans l'huile est favorisée par la présence d'acides gras à chaîne courte, tandis que le degré d'insaturation a peu d'impact [398,399]. Or, l'huile de jojoba contient des acides gras à longue chaîne et est la plus apolaire de toutes les huiles testées, ce qui pourrait expliquer sa faible capacité d'extraction des apocaroténoïdes. Les huiles vierges sont généralement décrites comme plus efficaces pour l'extraction végétale que les huiles raffinées parce qu'elles contiennent des composés amphiphiles [264,400]. Cependant, Chutia et Mahanta ont montré que l'extraction des caroténoïdes est influencée par la température dans l'huile d'olive, mais pas dans l'huile de tournesol [398]. Cette différence serait, d'après les auteurs, due à la thermolabilité de l'huile d'olive, qui causerait des modifications de sa composition et affecterait sa capacité d'extraction. Ce phénomène

pourrait expliquer pourquoi l'huile de tournesol est plus efficace ici que l'huile d'olive pour extraire le colorant du roucou.

### 2. Activité antioxydantes des phases huiles

L'activité antioxydante de la phase huile a été étudiée afin d'évaluer, d'une part, la capacité antioxydante de l'huile utilisée comme solvant et, d'autre part, sa capacité d'extraction de composés antioxydants. Pour la phase huile, un test DPPH a été réalisé sur l'huile et sur l'extract, dilués par 2 dans l'heptane (Figure III-9).

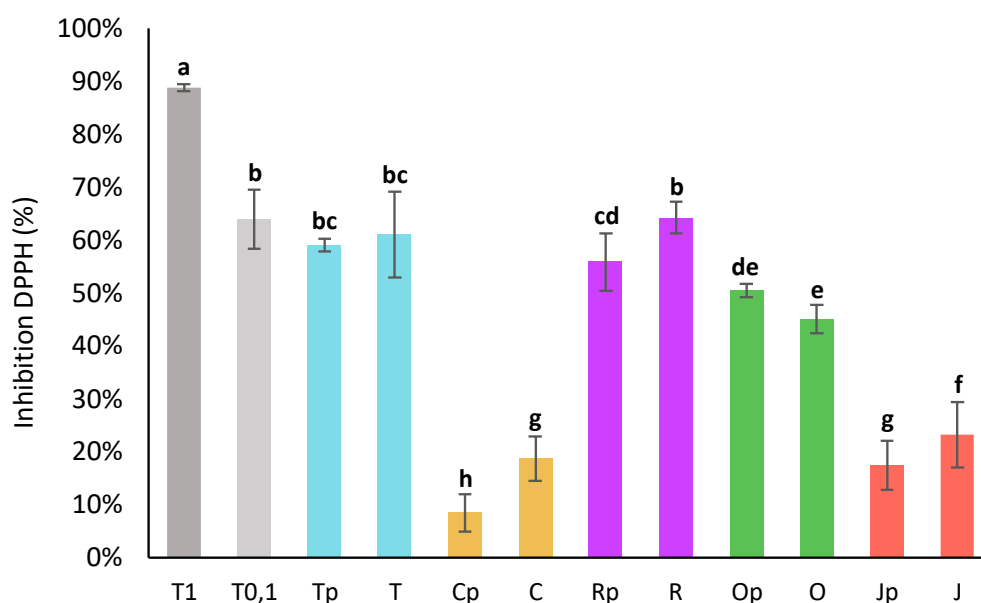


**Figure III-9 :** Activité antioxydante des huiles et phases huiles diluées par 2 mesurée par la capacité d'inhibition du DPPH. L'activité du trolox à 1 mg/mL (T1) et 0,1 mg/mL (T0,1) est utilisée comme référence. T : tournesol, C : coco, R : raisin, O : olive, J : jojoba. Tp, Cp, Rp, Op et Jp correspondent aux huiles, testées avant extraction. Les lettres a-e différentes désignent des taux d'inhibition significativement différents d'après l'analyse de variance.

Les huiles étudiées ont une capacité antioxydante très différente, allant de  $8 \pm 4\%$  pour l'huile de coco à  $59 \pm 1\%$  pour l'huile de pépins de raisins (Figure III-9). L'activité DPPH des huiles semble corrélée à leur richesse en acides gras insaturés, une corrélation déjà décrite par Sabudak *et al.* sur les huiles de différentes espèces de *Trifolium* [401].

L'activité antioxydante des extraits est légèrement plus élevée que celle des huiles pures, ce qui peut être expliqué par l'extraction de la bixine et d'autres composés comme les caroténoïdes ou les tocols, qui sont des antioxydants connus [333,402]. L'extract obtenu avec l'huile d'olive est la seule exception, son activité antioxydante étant légèrement plus faible

## CHAPITRE III

que celle de l'huile seule. Cela pourrait s'expliquer par la dégradation ou le partage dans la phase eau de certains composés amphiphiles durant l'extraction.

Une analyse de variance a été réalisée afin d'évaluer la significativité de ces différences (Figure III-9). En fonction des échantillons, la différence entre les taux d'inhibition de l'huile et de l'extrait n'est pas toujours significative (huile de tournesol par exemple), ce qui signifie que l'analyse de variance ne permet pas de montrer une différence entre les échantillons comparés dans ces conditions.

L'huile de tournesol et l'huile de pépins de raisin permettent d'obtenir les extraits les plus antioxydants avec une inhibition du DPPH de  $59 \pm 1\%$  et  $56 \pm 5\%$  respectivement. Comme indiqué précédemment, ce résultat est probablement dû à leur richesse en acides gras insaturés.

### 3. Activité antioxydante des phases eau

Afin de déterminer si la phase eau est elle aussi impactée par le choix de l'huile, la capacité antioxydante des phases eau obtenues avec les différentes huiles a été étudiée (Figure III-10). Pour des raisons de solubilité, un test ABTS a cette fois été réalisé. Comme le test DPPH, il mesure l'activité anti-radicalaire des extraits, la différence étant le radical utilisé (Méthode en Annexe 11).

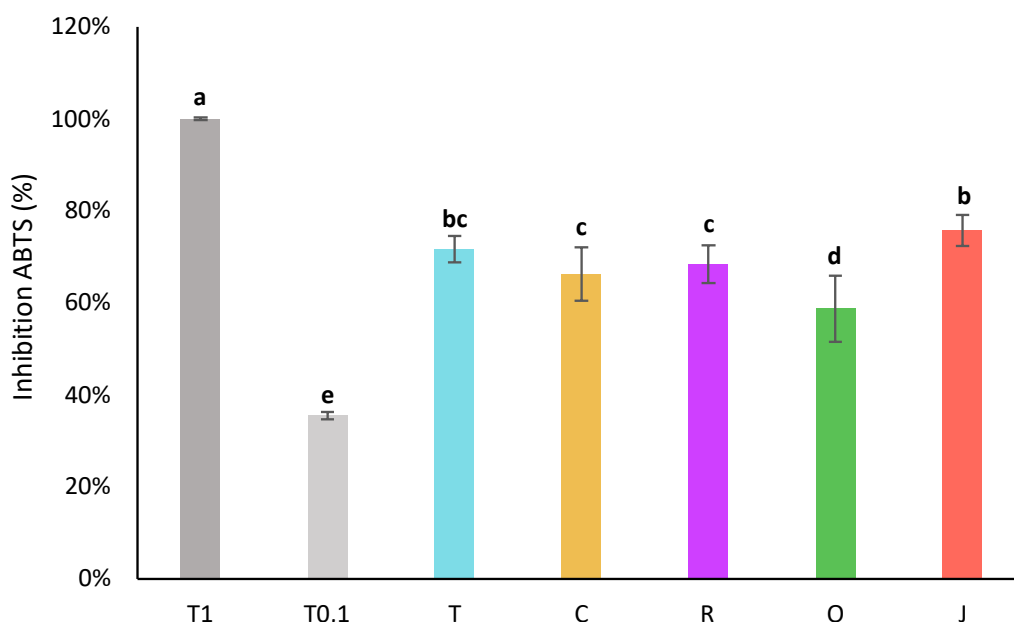


**Figure III-10 :** Activité antioxydante des phases aqueuses diluées par 2 mesurée par la capacité d'inhibition de l'ABTS. L'activité du trolox à 1 mg/mL (T1) et 0,1 mg/mL (T0,1) est utilisée comme référence. T : tournesol, C : coco, R : raisin, O : olive, J : jojoba. Les lettres a-e différentes désignent des extraits significativement différents d'après l'analyse de variance.

## CHAPITRE III

Pour tous les extraits, une inhibition du radical ABTS autour de  $68 \pm 6\%$  a été observée, indiquant une faible différence d'activité entre les différents extraits. D'après l'analyse de variance, l'activité de la phase eau du système eau/huile d'olive est légèrement en deçà des autres, tandis que les phases eau des systèmes eau/huile de tournesol et de jojoba ont une activité antioxydante légèrement plus élevée.

### 4. Composition des phases aqueuses obtenues avec les différentes huiles

Afin d'étudier plus en détail l'impact des huiles végétales sur la phase aqueuse des extraits, une analyse par UHPLC-HRMS a été réalisée. Les triplicats d'extraction, ainsi que 5 extraits de contrôle qualité contenant un volume égal de chaque extrait ont été analysés. Les données de masse obtenues en full scan pour chaque extrait ont été utilisées pour construire une matrice sur le logiciel MetaboScape 4.0. La matrice ainsi obtenue contient 15 échantillons et 5906 variables, correspondant chacune à un ion décrit par son temps de rétention et son rapport masse/charge ( $m/z$ ). L'analyse statistique de la matrice a été conduite sur MetaboAnalyst 6.0 après exclusion des ions dont l'écart-type relatif entre les échantillons de contrôle qualité est supérieur à 20% et des 40% d'ions dont l'écart-type est le plus faible entre les échantillons, correspondant aux ions présentant des intensités proches dans tous les échantillons. La matrice a été normalisée (option « quantile normalisation »), transformée (option « cube root transformation ») et mise à l'échelle (option « range-scaling »).

L'analyse en composantes principales (ACP) obtenue avec la matrice complète ne décrit pas l'entièreté de l'information. En effet, la première (PC1) et la deuxième (PC2) composantes ne représentent que 39,6% et 22,7% de l'information. De plus, cette ACP ne permet pas de discriminer les échantillons (Figure III-11 A).

Afin de pouvoir observer les différences éventuelles entre les échantillons, la matrice a alors été réduite pour n'inclure que les ions ayant des intensités significativement différentes entre les échantillons. Pour cela, une ANOVA a été appliquée à la matrice complète, ce qui a permis d'identifier les 91 ions discriminants parmi les 5906 de la matrice totale. La matrice réduite a été construite à partir de cette liste, puis traitée sur MetaboAnalyst 6.0 après normalisation (« median normalisation »), transformation (« square root transformation ») et mise à l'échelle (« Pareto scaling »).

### CHAPITRE III

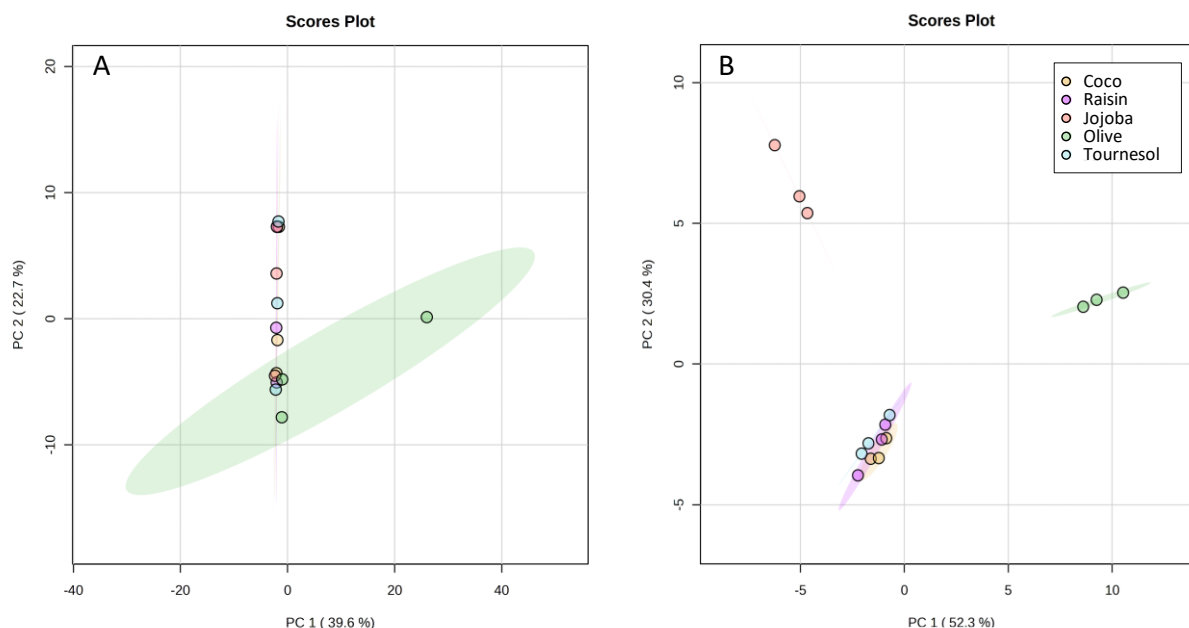


**Figure III-11** : ACP des analyses UHPLC-HRMS des phases aqueuses, construites à partir de la matrice complète (A) et de la matrice réduite (B). Les couleurs représentent les huiles d'extraction de chaque extrait : coco en jaune, raisin en violet, jojoba en rouge, olive en vert et tournesol en bleu.

L'ACP obtenue à partir de la matrice réduite montre une meilleure représentation de l'information par PC1 (52,3%) et PC2 (30,4%). De plus, elle permet de séparer les échantillons en 3 groupes distincts (Figure III-11 B). En effet, les extraits obtenus avec l'huile d'olive sont discriminés sur PC1, tandis que les extraits obtenus par l'huile de jojoba sont discriminés sur PC2. Ces deux huiles étant les deux seules huiles vierges de la sélection, cette séparation semble être due à la présence de composés amphiphiles dans l'huile qui pourraient être partagés dans la phase eau lors de l'extraction. En effet, l'huile d'olive est connue pour sa teneur en polyphénols [387], et l'huile de jojoba contient une faible quantité de flavonoïdes [385].

Afin d'identifier les différences de composition entre les groupes, une heatmap a été construite à partir des données de la matrice réduite (Figure III-12). Les 91 ions de la matrice couvrent une large gamme de polarité, avec des temps de rétention allant de 2,2 à 15,8 min.

Parmi les 91 ions de la matrice, 38 sont spécifiques de la phase aqueuse issue de l'extrait eau/huile d'olive, 17 de l'extrait eau/huile de jojoba et 31 présentent une intensité plus élevée dans les phases eau issues du système eau/huile de tournesol, eau/huile de coco ou eau/huile de pépins de raisin. Les 5 derniers ions ne permettent pas de discriminer les extraits et ne sont pas affichés sur la heatmap.

### CHAPITRE III

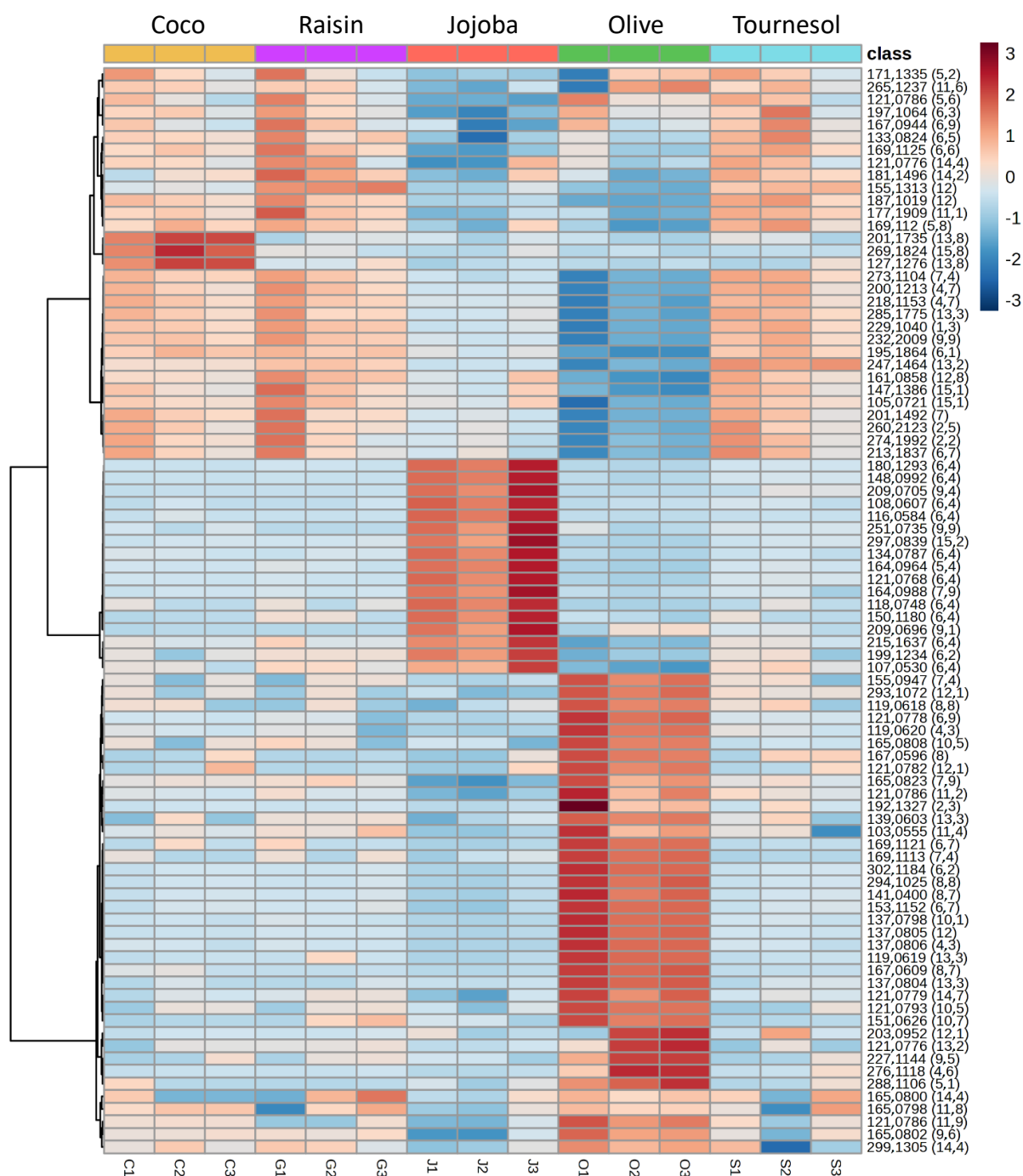


**Figure III-12 :** Heatmap représentant l'intensité des ions de la matrice réduite. L'intensité relative de chaque ion détecté par spectrométrie de masse est représentée selon une échelle allant du bleu (faible intensité) au rouge (intensité élevée). Les phases aqueuses de 3 réplicats indépendants ont été analysées pour chaque huile. Les ions sont ordonnés par similarité d'intensité entre les échantillons.

Ainsi, les phases aqueuses obtenues avec les systèmes eau/huile de coco, de jojoba ou de pépin de raisin ont un profil similaire, tandis que les phases aqueuses du système eau/huile d'olive et eau/huile de jojoba ont chacune un profil spécifique. La heatmap a permis

## CHAPITRE III

d'identifier les ions qui ont permis la discrimination des différents extraits dans l'ACP. Des extractions d'ions ont ensuite été réalisées sur les chromatogrammes obtenus par UHPLC-HRMS, afin de remonter aux composés spécifiques à chaque extrait ou groupe d'extrait. Ce processus nous a permis de déterminer que la plupart des ions concernés correspondent à des composés minoritaires (élus au même temps de rétention que d'autres composés présents en plus grande concentration), voire à leurs fragments. Pour l'extrait jojoba par exemple, 9 des ions significatifs sont en fait des fragments d'un unique composé élué à 6,4 min. Celui-ci n'a pas pu être identifié en raison de sa faible intensité.

Les principaux composés extraits ne faisant pas partie de la matrice réduite, ils ont probablement été exclus car ils ne permettaient pas la différenciation des extraits. La composition des phases aqueuses est donc très proche quelle que soit l'huile utilisée. Ces résultats expliquent aussi la faible différence d'activité antioxydante entre les phases aqueuses.

D'après les résultats obtenus, l'huile de tournesol est la plus adaptée à la méthode d'extraction développée et permet d'obtenir la meilleure extraction du colorant, ainsi qu'une activité antioxydante élevée dans les deux phases.

## V. Composition de l'extrait

### A. Analyse par UHPLC-HRMS/MS de la phase eau

Les composés polaires de la graine du roucou sont relativement peu décrits par rapport à la fraction colorante ou aux composés apolaires [336]. En dehors des quelques composés phénoliques listés précédemment, les analyses des extraits aqueux s'arrêtent généralement à la caractérisation de la couleur ou à la détection de familles moléculaires par des tests colorimétriques. Ainsi, la présence de tanins, alcaloïdes et saponines a été détectée à plusieurs reprises, mais les composés correspondant n'ont pas été isolés ou identifiés [173,356].

Les principaux métabolites secondaires de la phase aqueuse de l'extrait optimal ont été identifiés par UHPLC-DAD-HRMS/MS. Afin de se concentrer sur les composés phénoliques et sur les colorants, seuls les composés absorbant à 280 nm ou à 540 nm ont été identifiés (Figure III-13). Les composés élués avant 2 min ont été identifiés comme des acides aminés et nucléosides et ne sont pas décrits ici.

### CHAPITRE III

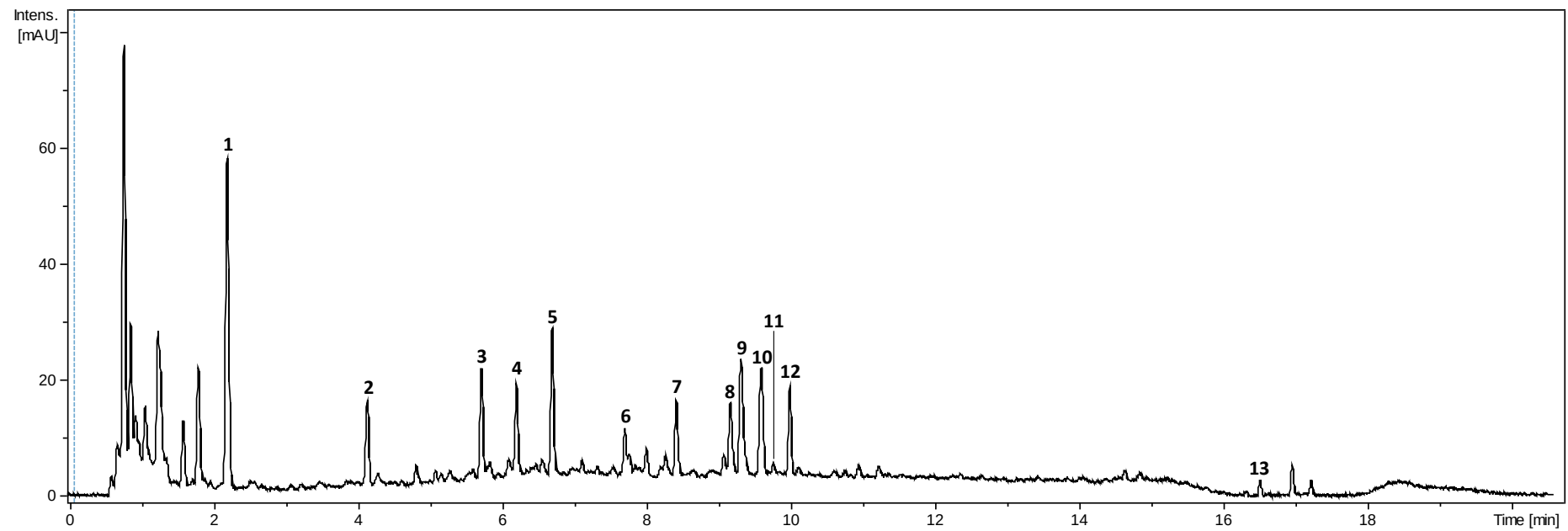


**Figure III-13 :** Chromatogramme à 280 nm et 465 nm.

## CHAPITRE III

Pour chaque pic détecté, une formule moléculaire a été proposée avec une tolérance de 5 ppm pour la MS et de 10 ppm pour la MS/MS. Les adduits  $[M+Na]^+$  et  $[M+NH_4]^+$ , ainsi que la comparaison des données obtenues en ionisation positive et négative ont été utilisées pour corroborer les formules moléculaires. Ces dernières ont ensuite été soumises à des bases de données publiques (SciFinder, KNapSack et Pubchem) et comparées à la littérature afin de suggérer une identification putative pour chaque composé. Le Tableau III-6 récapitule les temps de rétention,  $m/z$ , formule moléculaire, description des fragments,  $\lambda_{max}$  et proposition d'identification pour chaque composé.

### 1. Acides phénoliques

Le composé **1** a été détecté à  $m/z$  171,0291 en  $MS^+$  et  $\lambda_{max}$  270 nm. La formule moléculaire proposée pour ce composé est  $C_7H_6O_5$ . Des fragments correspondant à une perte d'eau ( $H_2O$ , 18 u) et d'un groupement  $CO_2$  (44 u) ont été détectés à  $m/z$  135,0078 et 107,0099. Deux autres fragments ont été détectés à  $m/z$  125,0227 ( $C_6H_5O_3^+$ ) et 109,0281 ( $C_6H_5O_2^+$ ) après la perte consécutive d' $H_2O$  (18 u) et  $CO$  (28 u). La formule moléculaire, le spectre UV et la fragmentation correspondent à ceux décrits pour l'acide gallique [403]. De plus, le spectre de fragmentation du composé **1** concorde avec celui d'un standard acide gallique présent dans une base de données interne au laboratoire.

Le composé **2** a été détecté à  $m/z$  155,0338 en  $MS^+$  et  $\lambda_{max}$  258, 292 nm. La formule proposée pour ce composé est  $C_7H_6O_4$ . Deux fragments correspondant à une perte d'eau ( $H_2O$ , 18 u) et de  $CO_2$  (44 u) ont été détectés à  $m/z$  137,0237 et 111,0164. Un autre fragment correspondant aux deux pertes consécutives a été détecté à  $m/z$  93,0334 ( $C_6H_5O^+$ ). Une telle fragmentation a déjà été décrite pour l'acide dihydroxybenzoïque en mode négatif [404]. D'après les  $\lambda_{max}$ , le composé **2** correspondrait spécifiquement à l'acide 2,6-dihydroxybenzoïque ou à l'acide protocatéchique (acide 3,4-dihydroxybenzoïque) [405]. Le composé **2** est présumé être l'acide protocatéchique car celui-ci est un métabolite spécialisé décrit dans de nombreuses plantes [406].

Le composé **3** a été détecté à  $m/z$  445,2069 ( $[M+H]^+$ ) et 427,1964 ( $[M+H-H_2O]^+$ ) après une fragmentation en source. La formule proposée pour ce composé est  $C_{21}H_{32}O_{10}$ . Deux fragments ont été détectés à  $m/z$  265,1438 et 247,1308 après la perte consécutive d'un hexose (162 u) et d' $H_2O$  (18 u). D'après la formule moléculaire, le spectre UV ( $\lambda_{max}$  168 nm) et la fragmentation, le composé **3** correspond à l'acide dihydroxyphaséique glucoside, un

## CHAPITRE III

métabolite issu de l'oxydation de l'acide abscissique [407]. L'acide abscissique est une phytohormone synthétisée à partir des caroténoïdes [408].

Le composé **4** a été détecté en  $MS^+$  à  $m/z$  293,0302. La formule proposée pour ce composé est  $C_{13}H_8O_8$ . Des fragments ont été détectés à  $m/z$  275,0184 et 265,0333 après une perte d'eau (18 u) et de CO (28 u). Deux autres fragments ont été détectés à  $m/z$  205,0133 ( $C_{10}H_5O_5^+$ ) et 177,0184 ( $C_9H_5O_4^+$ ). Enfin, des fragments caractéristiques de l'acide brevifolincarboxylique ont été détectés à  $m/z$  247,0236 ( $C_{12}H_7O_6^+$ ), 219,0289 ( $C_{11}H_7O_5^+$ ), 191,0339 ( $C_{10}H_7O_4^+$ ) et 163,0390 ( $C_9H_7O_3^+$ ) [409]. Cette hypothèse d'identification est appuyée par le spectre UV ( $\lambda_{max}$  276, 357 nm) [410].

### 2. Ellagitanins

Les ellagitanins sont des esters de HHDP (galloyl-bis-hexahydroxydiphénol) avec un sucre, généralement du glucose et parfois avec de l'acide gallique. Leur spectre de fragmentation se caractérise généralement par une perte d'HHDP, converti en acide ellagique (302 u), de glucose (162 u) ou d'acide gallique (170 u), menant à un fragment correspondant à l'acide ellagique ( $m/z$  303 en ionisation positive) [411].

Le composé **5** a été détecté à  $m/z$  635,0853 et  $\lambda_{max}$  270 nm. La formule moléculaire proposée pour ce composé est  $C_{27}H_{22}O_8$ . Le profil de fragmentation correspond à celui des ellagitanins avec une perte d'acide gallique (170 u) détectée à  $m/z$  465,0663, une perte d'hexose (162 u) détectée à  $m/z$  303,0082 et un fragment correspondant à l'acide ellagique [411]. D'après ces données, le composé **5** correspond au galloyl-HHDP-glucose.

Le composé **7** a été détecté à  $m/z$  303,0142 en  $MS^+$  et  $\lambda_{max}$  252, 356 nm. La formule moléculaire proposée pour ce composé est  $C_{14}H_6O_8$ , ce qui correspond à l'acide ellagique. La fragmentation en  $MS^-$  corrobore cette hypothèse avec des fragments détectés à  $m/z$  283,9928, 257,0066, 245,0088, 229,0135, 185,0240 et 173,0261 [412].

Les composés **8-10** partagent un fragment commun à  $m/z$  317,03, qui correspond à l'ion moléculaire des composés **11** et **12**. La formule proposée pour cet ion est  $C_{15}H_8O_8$ . D'après leur formule moléculaire et leur spectre UV ( $\lambda_{max}$  235, 250, 365 nm approximativement), les composés **11** et **12** correspondent à deux isomères d'acide O-méthylellagique [413]. Les composés **8** et **9** ont été détectés à  $m/z$  396,99 en  $MS^+$ . Ils se sont fragmentés en acide O-méthylellagique après une perte de 80 u, correspondant à un groupement sulfate. La structure

## CHAPITRE III

proposée pour ces composés est  $C_{15}H_8O_{11}S$  et ils ont été identifiés comme des dérivés sulfatés d'acide O-méthylellagique. Ce type de composés a déjà été identifié dans quelques plantes, mais reste rare et leur identification formelle nécessiterait une analyse structurale plus poussée [414,415]. Néanmoins, ce n'est pas la première description de composés phénoliques sulfatés dans cette plante, puisque des flavonoïdes sulfatés ont déjà été décrits dans les feuilles de roucou [331]. Le composé **10** a été détecté à  $m/z$  463,0878 en  $MS^+$  et  $\lambda_{max}$  247, 364 nm. La formule moléculaire proposée pour ce composé est  $C_{21}H_{18}O_{12}$ . Le composé **10** s'est fragmenté en acide O-méthylellagique après une perte de déoxyhexose (146 u). D'après ces données, le composé **10** correspond à l'acide O-méthylellagique déoxyhexose.

### 3. Autres composés détectés

Le composé **6** a été détecté à  $m/z$  383,2067 en  $MS^+$  et 381,1901 en  $MS^-$  et  $\lambda_{max}$  285 nm. La formule moléculaire proposée pour ce composé est  $C_{20}H_{30}O_7$ . Des fragments ont été détectés en ionisation positive à  $m/z$  365,1954 et 347,1864 après des pertes d'eau (18 u). D'autres fragments ont été détectés à  $m/z$  283,1672 ( $C_{19}H_{23}O_2^+$ ) et 165,0916 ( $C_{10}H_{13}O_2^+$ ). Ces données ont été comparées à la littérature et aux entrées des bases de données (SciFinder, KNapSack et Pubchem) pour la formule moléculaire proposée, mais le composé **6** n'a pas pu être identifié.

Le composé **13** a été détecté en  $MS^+$  à  $m/z$  381,2058 avec un spectre UV caractéristique des caroténoïdes ( $\lambda_{max}$  429, 455, 485 nm). La formule moléculaire proposée est  $C_{24}H_{28}O_4$ . Un fragment a été détecté à  $m/z$  363,1950 après une perte d'eau (18 u). Le composé **13** a été identifié comme la norbixine, un dérivé hydrophile de la bixine faisant partie des principaux colorants du roucou [331,338,342].

### CHAPITRE III

**Tableau III-6 :** Caractérisation de la phase eau de l'extrait optimal par UHPLC-DAD-HRMS/MS.

| # | Tr<br>(min) | m/z<br>([M+H] <sup>+</sup> ) | Erreur<br>(ppm) | m/z<br>([M-H] <sup>-</sup> ) | Erreur<br>(ppm) | Formule                                         | MS/MS <sup>+</sup> (intensité)                                                                                                                              | MS/MS <sup>-</sup> (intensité)                                                                                                                                                          | λ <sub>max</sub> (nm) | Hypothèse d'identification            |
|---|-------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| 1 | 2,23        | 171,0291                     | -1,7            | 169,0138                     | 2,7             | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>    | 153,0182 (77309)<br>135,0078 (7878)<br>127,0388 (50839)<br>125,0227 (38830)<br>109,0281 (35417)<br>107,0099 (10599)                                         |                                                                                                                                                                                         | 270                   | Acide gallique                        |
| 2 | 4,16        | 155,0338                     | 0,7             | 153,0185                     | 3               | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>    | 137,0237 (29126)<br>111,0164 (17475)<br>93,0334 (3482)                                                                                                      |                                                                                                                                                                                         | 258, 292              | Acide protocatéchique                 |
| 3 | 5,75        | 445,2069                     | -0,2            | 443,1921                     | 0,4             | C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub> | 265,1438 (18095)<br>247,1308 (3248)                                                                                                                         | 281,1369 (1045)<br>263,1292 (500)<br>237,1489 (1975)<br>219,1361 (2263)<br>201,1274 (504)<br>189,1251 (1281)<br>179,0558 (729)<br>161,0446 (1535)<br>119,0352 (1532)<br>113,0244 (2084) | 266                   | acide dihydroxyphaséique<br>glucoside |
| 4 | 6,22        | 293,0302                     | -3,6            | 291,0133                     | 4,6             | C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub>   | 275,0184 (9895)<br>265,0333 (7850)<br>247,0236 (44737)<br>219,0289 (112482)<br>205,0133 (16005)<br>191,0339 (35272)<br>177,0184 (21638)<br>163,0390 (45035) | 247,0238 (97693)<br>219,0280 (16915)<br>191,0339 (47419)<br>173,0224 (11496)<br>163,0394 (6121)<br>147,0455 (7879)<br>145,0291 (10327)                                                  | 276, 357              | Acide brevifolincarboxylique          |

### CHAPITRE III

|    |      |          |      |          |      |                                                  |                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                    |                       |                                          |
|----|------|----------|------|----------|------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------|
| 5  | 6,72 | 635,0853 | 4,1  | 633,0729 | 0,7  | C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>18</sub>  | 465,0663 (169038)<br>321,024 (65207)<br>303,0082 (42157)<br>277,0345 (120888)                                                                             | 463,0499 (110807)<br>419,0604 (16835)<br>300,9978 (139141)<br>275,0182 (46930)                                                                                                                                                     | 270                   | Galloyl-HHDP-glucose                     |
| 6  | 7,73 | 383,2067 | -0,6 | 381,1901 | 4,7  | C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>   | 365,1954 (8265)<br>347,1864 (2982)<br>283,1672 (2909)<br>165,0916 (2074)                                                                                  | 337,2004 (14030)                                                                                                                                                                                                                   | 285                   | Non identifié                            |
| 7  | 8,44 | 303,0142 | -2,3 | 300,9990 | 4,2  | C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>    | 285,0039 (10599)<br>275,0208 (15689)<br>257,0081 (25410)<br>247,0256 (9045)<br>229,0133 (12687)<br>201,0183 (14626)<br>173,0234 (8093)<br>145,0282 (3723) | 283,9928 (16311)<br>273,0033 (2226)<br>257,0066 (7373)<br>245,0088 (8087)<br>229,0135 (14017)<br>217,0133 (3027)<br>201,0159 (8841)<br>185,0240 (7621)<br>173,0261 (5121)<br>157,0288 (3054)<br>145,0293 (2019)<br>129,0343 (2037) | 252, 295<br>(sh), 359 | Acide ellagique                          |
| 8  | 9,19 | 396,9862 | -0,4 | 394,9706 | -2,0 | C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>11</sub> S | 317,0292 (24927)<br>302,0057 (7488)<br>257,0080 (2220)                                                                                                    | 315,0105 (187933)<br>299,9902 (190471)                                                                                                                                                                                             | 248, 359              | Dérivé sulfaté d'acide O-méthylellagique |
| 9  | 9,33 | 396,9860 | -1,0 | 394,9701 | 3,4  | C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>11</sub> S | 317,0289 (22803)<br>284,9989 (1076)<br>257,0063 (4280)<br>222,1122 (2321)                                                                                 | 315,0105 (120225)<br>299,9902 (138397)                                                                                                                                                                                             | 248, 359              | Dérivé sulfaté d'acide O-méthylellagique |
| 10 | 9,63 | 463,0878 | -1,4 | 461,0706 | 4,3  | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>  | 317,0294 (150666)<br>147,0652 (5958)<br>129,0545 (20771)                                                                                                  | 315,0132 (95391)<br>299,9895 (68927)                                                                                                                                                                                               | 247, 364              | Acide méthylellagique déoxyhexose        |

### CHAPITRE III

|    |       |          |      |          |     |                   |                                                                                                                |                   |                  |                         |
|----|-------|----------|------|----------|-----|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------|-------------------------|
| 11 | 9,78  | 317,0297 | -1,6 | 315,0146 | 4,1 | $C_{15}H_8O_8$    | 302,0055 (11216)<br>246,0156 (2008)                                                                            | 299,9893 (2786)   | 236, 254,<br>364 | Acide O-méthylellagique |
| 12 | 10,01 | 317,0299 | -2,0 | 315,0133 | 4,2 | $C_{15}H_8O_8$    | 302,0051 (4169)<br>285,0031 (7753)<br>257,0087 (9174)<br>246,0156 (1446)<br>218,0217 (1318)<br>201,0165 (2570) | 299,9903 (124255) | 235, 250,<br>366 | Acide O-méthylellagique |
| 13 | 16,51 | 381,2058 | 0,7  | N.D.     | -   | $C_{24}H_{28}O_4$ | 363,1950 (1923)<br>145,1008 (10344)                                                                            |                   | 429, 455,<br>485 | Norbixine               |

## B. Analyse de la composition de la phase huile

### 1. Extraction liquide-liquide

Une étape d'extraction liquide-liquide (LLE) a été réalisée afin de séparer les molécules d'intérêt, minoritaires dans la phase huile, de la fraction lipidique. Pour cela, le méthanol, un solvant décrit comme efficace pour l'extraction de la bixine, mais assez polaire pour éviter l'extraction des acides gras de l'huile a été choisi [372]. La LLE a été réalisée en trois cycles identiques avec 1 mL de méthanol pour 1 mL de phase huile. Les 3 mL d'extrait méthanolique ainsi obtenus ont été rassemblés puis injectés en UHPLC-HRMS/MS. L'huile de tournesol a été extraite par la même méthode afin de concentrer l'identification sur les molécules issues du roucou et non de l'huile.

### 2. Analyse UHPLC-HRMS/MS

Les extraits méthanoliques issus de la phase huile et de l'huile de tournesol ont été analysés par UHPLC-HRMS/MS. Deux composés ont été détectés à 280 nm dans l'extrait issu de la phase huile mais pas dans l'extrait correspondant à l'huile de tournesol, indiquant qu'ils proviennent du roucou (Figure III-14).

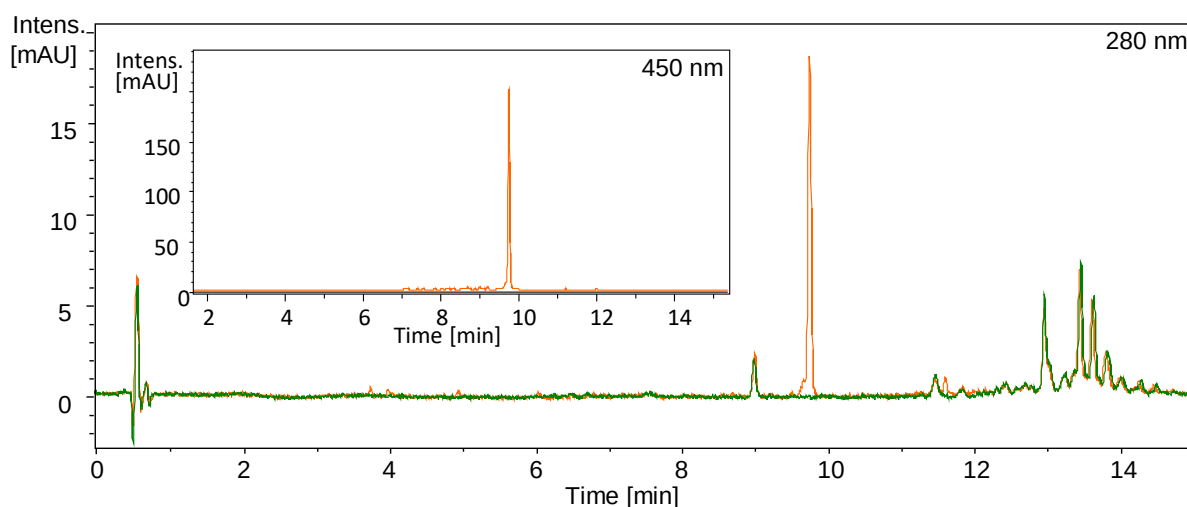


**Figure III-14** : Chromatogrammes à 280 nm et 450 nm des extraits méthanoliques issus de la phase huile de l'extrait biphasique de roucou (orange) et de l'huile de tournesol pure (vert).

Le premier a été détecté à 9,77 min à  $m/z$  395,2220 et  $\lambda_{max}$  432, 459, 486. La masse exacte, la proposition de formule ( $C_{25}H_{30}O_4$ ) et le spectre d'absorption correspondent à la bixine [338]. Le profil de fragmentation correspond aussi aux descriptions de la littérature avec des fragments détectés à  $m/z$  377,2109, 363,1943, 335,1907 et 317,1907 correspondant aux pertes consécutives d' $H_2O$  (18 u),  $CH_3OH$  (32 u), CO (28 u) et  $H_2O$  (18 u) [338]. D'après la

## CHAPITRE III

littérature, la bixine représente plus de 80% du colorant extrait du roucou [330]. Or, l'aire du pic de bixine détecté à 450 nm correspond à 90% de l'aire totale des pics détectés à cette longueur d'onde.

Le second composé issu du roucou a été détecté à 11,60 min,  $m/z$  397,3105 et  $\lambda_{max}$  295 nm. La formule proposée pour ce composé est  $C_{27}H_{40}O_2$ . Ces résultats correspondent au  $\delta$ -tocotriénol, un autre composé apolaire majoritaire du roucou [338]. Le profil de fragmentation appuie l'identification avec des fragments décrits précédemment dans la littérature détectés à  $m/z$  191,1061, 177,0906 et 137,0595 [338].

### 3. Comparaison à un extrait de référence

Un extrait de référence a été réalisé afin de confirmer que tous les composés apolaires d'intérêt du roucou ont pu être extraits par l'huile puis par LLE avec le méthanol afin d'être identifiés. Pour cela, une extraction assistée par ultrasons de 30 min a été réalisée dans un bain à ultrasons avec 1 g de roucou pour 20 mL d'acétate d'éthyle. Cet extrait a été analysé par UHPLC-HRMS avec la même méthode que l'extrait méthanolique de la phase huile (Figure III-15) (Méthode en Annexe 7).

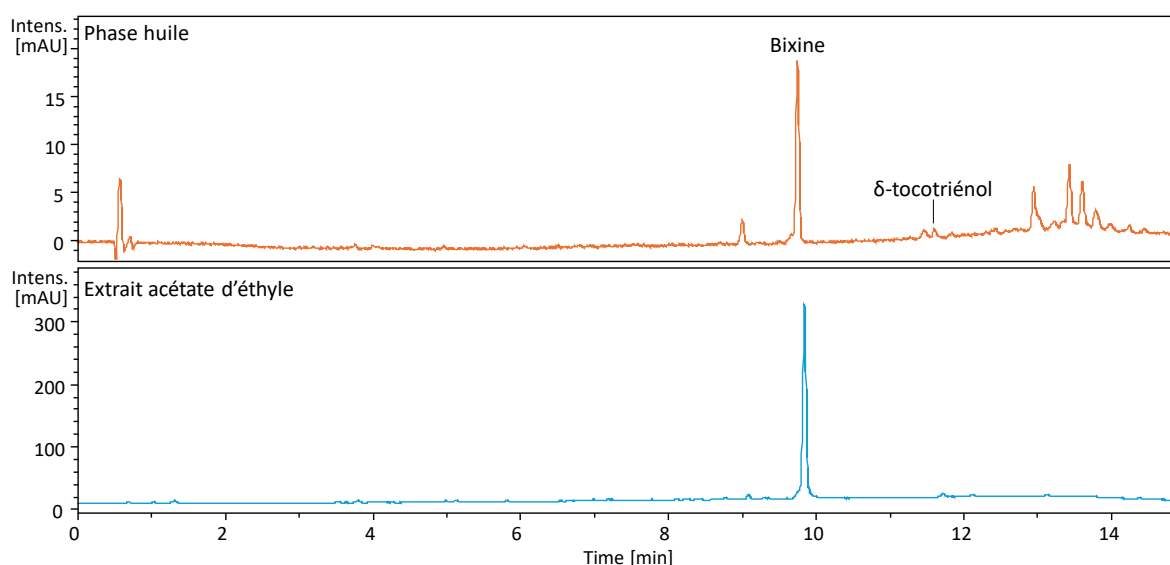


**Figure III-15 :** Chromatogrammes UHPLC-UV (280 nm) de l'extrait méthanolique de la phase huile de l'extrait biphasique de roucou (orange) et de l'extrait acétate d'éthyle de roucou (bleu).

Le profil chromatographique à 280 nm, ainsi qu'aux autres longueurs d'ondes (200-700 nm) de l'extrait acétate d'éthyle ne comporte qu'un seul pic largement majoritaire correspondant à la bixine montrant qu'il ne semble pas y avoir d'autres composés apolaires majoritaires qui n'auraient pas été extraits par l'huile de tournesol.

## CHAPITRE III

### 4. Dosage du colorant

Le dosage de la bixine a été réalisé suivant la méthode décrite dans la monographie sur les additifs alimentaires publiée par le comité mixte FAO/OMS [416] modifiée par Albuquerque et Meireles [417]. Dans un premier temps, l'absorbance à 487 nm de la phase huile diluée par 20 dans l'acétone a été mesurée. Ensuite, la concentration en bixine a été calculée à partir de la loi de Beer-Lambert (Equation III-1).

$$\text{Loi de Beer-Lambert} \quad Abs = \varepsilon \ell C \quad (III-1)$$

$$\text{Calcul de la concentration (mg eq. Bixine/mL)} \quad C = \frac{Abs \times D}{E_{1\%}^{1\text{cm}}}$$

Avec Abs : absorbance à 450 nm, D : facteur de dilution (20) et  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = \varepsilon \ell = 3090$  [416]

Une absorbance à 487 nm de 1,1431 u.a. a été mesurée, ce qui correspond à une concentration de  $9,26 \cdot 10^{-3}$  mg de bixine/mL. L'extrait contient donc environ 0,9% de matière colorante, ce qui est proche du maximum de solubilité de la bixine dans l'huile (1%) [355].

### C. Analyse de la fraction volatile par SPME-GC-MS

La graine de roucou est utilisée traditionnellement pour son colorant, mais aussi comme épice, en raison de sa richesse en composés volatils [331]. Une micro-extraction sur phase solide a été réalisée à partir de l'espace de tête de l'extrait optimal complet puis analysée par GC-MS afin d'identifier les composés volatils présents dans l'extrait optimal de roucou.

#### 1. Préparation d'échantillon

Pour réaliser la micro-extraction sur phase solide (SPME), l'extrait biphasique complet a été secoué énergiquement afin de mélanger les deux phases pour qu'elles aient une interface avec l'air. L'extrait a ensuite été transféré dans un flacon pour espace de tête et chauffé à 60°C au bain-marie sous agitation pendant 45 min. La fibre SPME a ensuite été exposée dans l'espace de tête de l'échantillon pendant 30 min, en maintenant le bain-marie à 60°C. Le même processus a été réalisé sur le solvant d'extraction (eau/huile de tournesol, 50/50) afin de pouvoir différencier les composés provenant de la plante et ceux provenant des solvants d'extraction.

#### 2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

La méthode utilisée pour la chromatographie en phase gazeuse de l'échantillon est décrite en Annexe 8. Les hypothèses d'identification ont été obtenues par comparaison du spectre de masse et de l'indice de rétention de chaque composé à la base de données NIST 20. L'indice

## CHAPITRE III

de rétention (IR) des composés a été calculé à partir du calcul de Van Den Dool et Kratz (Equation III-2) [418] en utilisant les temps de rétention d'une série d'alcane (C8-C20) analysée dans les mêmes conditions que l'extrait.

$$IR = 100 \times \left[ \frac{Tr_{ech} - Tr_n}{Tr_{n+1} - Tr_n} \right] \quad (III-2)$$

avec Tr : temps de rétention, ech : le composé à identifier, n et n+1 : alcanes dont le temps de rétention encadre le composé à identifier

L'analyse par GC-MS a permis de détecter 52 composés, dont 21 pour lesquels une hypothèse d'identification a pu être proposée (Tableau III-7). L'hétérocycle et les alcanes identifiés (labellisés par un astérisque dans le Tableau III-7) ont été retrouvés à la fois dans l'extrait et dans le solvant, ce qui indique qu'ils viennent probablement de l'huile de tournesol.

**Tableau III-7 : Composés volatils identifiés dans l'extrait optimal**

| Hypothèse d'identification          | Correspondance<br>NIST <sup>a</sup> | IR<br>référence <sup>a</sup> | IR<br>expérimental | Aire <sup>b</sup> |
|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|--------------------|-------------------|
| <b>Hétérocycles</b>                 |                                     |                              |                    |                   |
| 1,3-bis(1,1-diméthyléthyl)-benzène* | 859                                 | 1249                         | 1246               | +                 |
| <b>Alcanes</b>                      |                                     |                              |                    |                   |
| 4-méthyl-octane*                    | 863                                 | 861                          | 864                | +                 |
| 2-méthyl-nonane*                    | 746                                 | 964                          | 967                | +                 |
| Décane*                             | 894                                 | 1000                         | 1002               | +                 |
| 2,5-Diméthylnonane*                 | 759                                 | 1021                         | 1020               | tr                |
| 2,6-diméthyl-nonane*                | 724                                 | 1018                         | 1023               | +                 |
| Undécane*                           | 776                                 | 1100                         | 110                | +                 |
| Dodécane*                           | 892                                 | 1200                         | 1200               | ++                |
| 2,6-diméthyl-undécane*              | 742                                 | 1210                         | 1213               | +                 |
| 2,6,11-triméthylododécane*          | 770                                 | 1275                         | 1274               | +                 |
| 4,6-diméthylododécane*              | 773                                 | 1325                         | 1321               | +                 |
| Tétradécane*                        | 827                                 | 1400                         | 1400               | +                 |
| <b>Monoterpènes</b>                 |                                     |                              |                    |                   |
| α-pinène                            | 889                                 | 937                          | 933                | ++                |
| Sabinène                            | 845                                 | 974                          | 975                | +                 |
| Verbénone                           | 707                                 | 1204                         | 1204               | +                 |
| Sobrérol                            | 775                                 | 1388                         | 1378               | +                 |
| Géranylacétone                      | 771                                 | 1453                         | 1446               | +                 |
| <b>Sesquiterpènes</b>               |                                     |                              |                    |                   |
| Ishwarane                           | 808                                 | 1458                         | 1463               | +                 |
| Spathuléol                          | 841                                 | 1576                         | 1571               | +                 |
| Isospathuléol                       | 907                                 | 1638                         | 1623               | +++               |
| Néointermédéol                      | 754                                 | 1660                         | 1653               | +                 |

\* composés retrouvés à la fois dans l'extrait et dans le solvant

<sup>a</sup> données issues de la base de donnée NIST

<sup>b</sup> la proportion relative de l'aire de pics est indiquée : Tr : <1%, + : 1-5%, ++ : 5-10%, +++ : >10%

## CHAPITRE III

Parmi les composés exclusivement présents dans l'extrait, on retrouve 5 monoterpènes et 4 sesquiterpènes. Le principal monoterpène identifié est l' $\alpha$ -pinène, qui a déjà été décrit comme le monoterpène principal du roucou [345,351]. Les autres monoterpènes identifiés sont le sabinène, précédemment identifié dans le roucou [352], ainsi que la verbénone, le sobrérol et la géranylacétone. Ces derniers n'ont pas été décrits dans le roucou, cependant la géranylacétone est un apocaroténoïde issu d'une voie de biosynthèse proche de celle de la bixine [419]. Parmi les sesquiterpènes identifiés, on retrouve le spathulénol et l'ishwarane, précédemment décrits parmi les principaux composés volatils du roucou [345,351]. En revanche, le néointermédéol a déjà été détecté dans l'huile essentielle de la feuille de roucou [420], mais jamais dans la graine, tandis que l'isopathulénol qui correspond au pic le plus intense, n'a jamais été décrit dans le roucou.

## VI. Conclusions

Une méthode d'extraction assistée par ultrasons a été développée en combinant deux solvants verts couramment utilisés en cosmétique, l'eau et l'huile végétale. Celle-ci a permis d'extraire simultanément les composés polaires et apolaires du roucou (*Bixa orellana* L.). Ce procédé remplit plusieurs objectifs de l'extraction verte, tels que l'utilisation de solvants verts, la réduction du nombre d'étapes grâce à l'extraction simultanée de tous les composés d'intérêt, ainsi que la faible consommation d'énergie et de solvants permises par l'extraction assistée par ultrasons.

L'optimisation de la méthode d'extraction a été réalisée en deux étapes. D'abord, plusieurs paramètres d'extraction ont été optimisés afin d'obtenir l'extrait le plus riche en composés phénoliques et bixine (colorant du roucou). Les conditions optimales d'extraction correspondent à 35 min d'extraction à 22,5 kHz avec 1 g/20 mL. Dans un second temps, plusieurs huiles végétales ont été étudiées afin de déterminer leur impact sur la composition et l'activité antioxydante des deux phases de l'extrait. L'huile de tournesol raffinée a permis d'obtenir la couleur la plus intense, correspondant à une meilleure extraction du colorant, principalement composé de bixine, un apocaroténoïde. L'activité antioxydante de la phase huile de l'extrait obtenu avec l'huile de tournesol, mesurée par le test d'activité DPPH, est aussi la plus élevée (autour de 60%). Cela est notamment dû à l'activité antioxydante de l'huile de tournesol en elle-même, qui est la plus élevée des 5 huiles évaluées. Les activités antioxydantes des phases aqueuses des différents extraits, mesurées par le test d'activité

### CHAPITRE III

ABTS, sont quant à elles toutes comparables, autour de 68%. Une analyse statistique des données obtenues suite à l'analyse UHPLC-HRMS de toutes les phases aqueuses montre que leur composition est très similaire, ne différant que par des composés minoritaires. D'après ces résultats, l'huile de tournesol a permis une extraction plus efficace du colorant et des actifs dans la phase huile. L'extrait optimal a donc été obtenu après 35 min d'extraction assistée par ultrasons à 22,5 kHz avec 1 g de roucou/ 20 mL de solvant eau/huile de tournesol (50/50).

Les deux phases de l'extrait optimal ont été caractérisées par UHPLC-HRMS/MS. Ainsi, 13 composés ont été identifiés dans la phase aqueuse, 4 acides phénoliques, 7 ellagitanins et la norbixine, le dérivé hydrosoluble de la bixine. La phase huile quant à elle contient du  $\delta$ -tocotriénol, ainsi que de la bixine, le colorant principal du roucou. Celle-ci représente 90% du colorant et 0,9% de la phase huile totale. La fraction volatile de l'extrait total a été caractérisée par SPME-GC-MS, menant à l'identification de 9 monoterpènes et sesquiterpènes, les principaux étant l' $\alpha$ -pinène et l'isopathulénol.

Cette méthode pourra être utilisée à plus grande échelle par l'entreprise Terre de Couleur pour obtenir un extrait dont chaque phase, ou l'extrait total peuvent être utilisés directement dans une formulation cosmétique en tant qu'ingrédient coloré et riche en antioxydants. De plus, dans l'optique de réduire encore le nombre d'étapes, un procédé d'extraction-formulation en une étape a été développé à partir de la méthode d'extraction présentée ici. Ce procédé sera présenté dans le chapitre 5 du manuscrit dédié à la valorisation cosmétique des extraits de la thèse

## Chapitre IV

### Extraction et stabilisation d'un colorant végétal hydrosoluble

### I. Introduction

Les deux chapitres précédents ont été consacrés au développement de méthodes d'extraction à l'eau efficaces pour des composés moyennement polaires ou apolaires. Cependant, pour certains colorants végétaux hydrosolubles, la difficulté n'est pas de les extraire avec de l'eau, mais de les maintenir suffisamment stables en solution pour être en mesure de les valoriser.

Le campêche est une plante tinctoriale originaire d'Amérique centrale, dont le colorant est principalement utilisé en histologie [421,422]. Le bois de cet arbre est caractéristique de par la couleur rouge de son duramen, due à la présence d'hématéine. Celle-ci est en réalité le produit d'oxydation de l'hématoxyline, un homoisoflavonoïde incolore [421,423].

La composition globale du duramen de campêche a été relativement peu étudiée. Plusieurs homoisoflavonoïdes et quelques composés phénoliques ont seulement été décrits. Parmi ces derniers, on retrouve notamment des flavonoïdes et acides phénoliques, réputés pour leurs nombreux intérêts en cosmétique [424]. Cependant, pour pouvoir être valorisé dans une formulation, un colorant végétal doit être stable pour éviter que la couleur du produit n'évolue dans le temps. Or, L'hématéine est particulièrement sensible à l'oxydation, qui cause rapidement sa dégradation et donc la diminution de l'intensité de sa couleur [425]. Elle change aussi de couleur en fonction du pH, étant orangée sous forme neutre à pH acide et violette à pH basique sous sa forme ionisée [425].

L'hématéine étant hydrosoluble, une méthode d'extraction assistée par ultrasons à l'eau a été utilisée sans optimisation pour l'extraire du duramen de campêche. La teneur en composés phénoliques et en hématéine de l'extrait aqueux a ensuite été déterminée et ses principaux composés ont été identifiés par UHPLC-HRMS/MS. Des extraits ont également été réalisés dans l'éthanol et l'acétate d'éthyle dans les mêmes conditions, afin d'évaluer la présence dans la plante d'autres composés moins polaires pour une meilleure caractérisation. Ensuite, la stabilité de l'extrait a été étudiée et différentes méthodes de stabilisation précédemment décrites pour d'autres colorants ou actifs végétaux ont été mises en place. L'acidification du solvant [426], l'ajout d'antioxydants [27,427], l'encapsulation par les cyclodextrines [27,66,268] et l'extraction par les NaDES [428,429] ont ainsi été envisagés et comparés. Dans l'optique de limiter le nombre d'étapes du procédé global et éviter l'évaporation du solvant, nous avons choisi de stabiliser l'extrait directement pendant l'extraction plutôt que lors d'une

## CHAPITRE IV

étape de pré- ou de post-traitement de l'extrait. Pour cela, l'évolution de l'absorbance de l'extrait à son  $\lambda_{\max}$  a été suivie pendant 20 à 48h en fonction des méthodes. Ce chapitre détaille donc l'étude d'un colorant peu décrit dans la littérature, ainsi que sa stabilisation.

## II. Le campêche (*Haematoxylum campechianum* L.)

### A. Description de la plante

Le campêche (*Haematoxylum campechianum* L.) est un arbre originaire d'Amérique centrale, mais qu'on retrouve aussi au Venezuela, dans les Caraïbes et à Madagascar [421]. Le genre *Haematoxylum* appartient à la famille des Fabaceae et à la sous-famille des Caesalpinioideae (Tableau IV-1) [421,422]. Il comprend deux espèces majeures : *H. campechianum* et *H. brasileto*, toutes deux réputées pour leur bois coloré, riche en homoisoflavonoïdes.

**Tableau IV-1 :** Classification du campêche selon la classification APG IV.

|                    |                                     |
|--------------------|-------------------------------------|
| Règne              | Plantae                             |
| Sous-embranchement | Angiospermes                        |
| Classe             | Eudicotylédones                     |
| Sous-classe        | Rosidae                             |
| Ordre              | Fabales Bromhead                    |
| Famille            | Fabaceae Juss.                      |
| Sous-famille       | Caesalpinioideae DC.                |
| Genre              | <i>Haematoxylum</i> L.              |
| Espèces            | <i>Haematoxylum campechianum</i> L. |

Le nom de genre tient son nom de cette caractéristique (en grec *haema* : sang et *xylon* : bois) [421,423]. Le nom du campêche vient quant à lui de l'état de Campeche située dans la péninsule du Yucatan au Mexique [421,423]. C'est un arbre ornemental à la croissance rapide qui peut atteindre 13 m de haut et 1,5 m de large [421]. Ses feuilles paripennées sont composées de 2 à 4 paires de folioles obcordées (Figure IV-1) [421,430]. Son inflorescence en grappes axillaires porte de petites fleurs jaunes parfumées aux sépales violets et il produit des petites gousses elliptiques aplaties produisant 2 à 3 graines (Figure IV-1) [421,430]. Le bois de campêche est dur et dense, à l'écorce grise, portant parfois des épines. Son duramen rouge cramoisi est la source de son colorant [421,422].

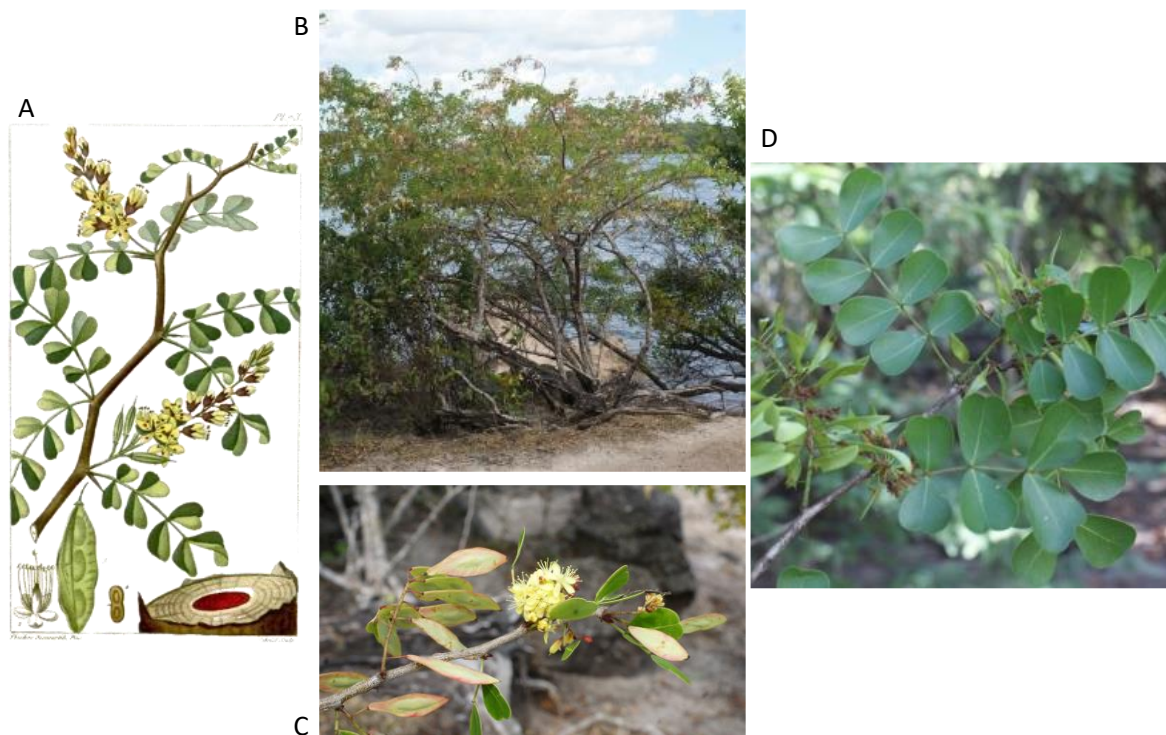


**Figure IV-1 :** Représentations du campêche (*Haematoxylum campechianum* L.). A : Illustration botanique provenant de la Flore pittoresque et médicale des Antilles, ou Histoire naturelle des plantes usuelles des colonies françaises, anglaises, espagnoles et portugaises [431], B, C et D : photographies de *Haematoxylum campechianum* présentes sur l'eFlore de Tela botanica. Auteur : Liliane Roubaudi [430].

### B. Composition

La composition phytochimique du campêche a été relativement peu étudiée. Son duramen est réputé pour sa richesse en hématoxylène et en hématéine, son dérivé d'oxydation responsable de la couleur rouge-violet de l'extrait. Cependant, d'autres homoisoflavonoïdes, quelques chalcones et flavonoïdes, ainsi que des acides phénoliques et tanins ont aussi été décrits [423,432,433].

#### 1. Homoisoflavonoïdes

Le campêche contient des homoisoflavonoïdes de type braziline, protosappanine, caesalpine et sappanine. Les principaux sont l'hématoxylène et l'hématéine (celle-ci étant un produit de dégradation de l'hématoxylène), des homoisoflavonoïdes de type braziline qui sont les marqueurs de la plante (Figure IV-2) [434]. L'hématoxylol B et ses dérivés, des homoisoflavonoïdes de type protosappanine ont aussi été décrits dans le campêche [432,434], ainsi que l'hématoxylol A (Figure IV-2), qui dérive du type protosappanine et sur lequel le groupement méthyle est remplacé par une cétone [423].

## CHAPITRE IV

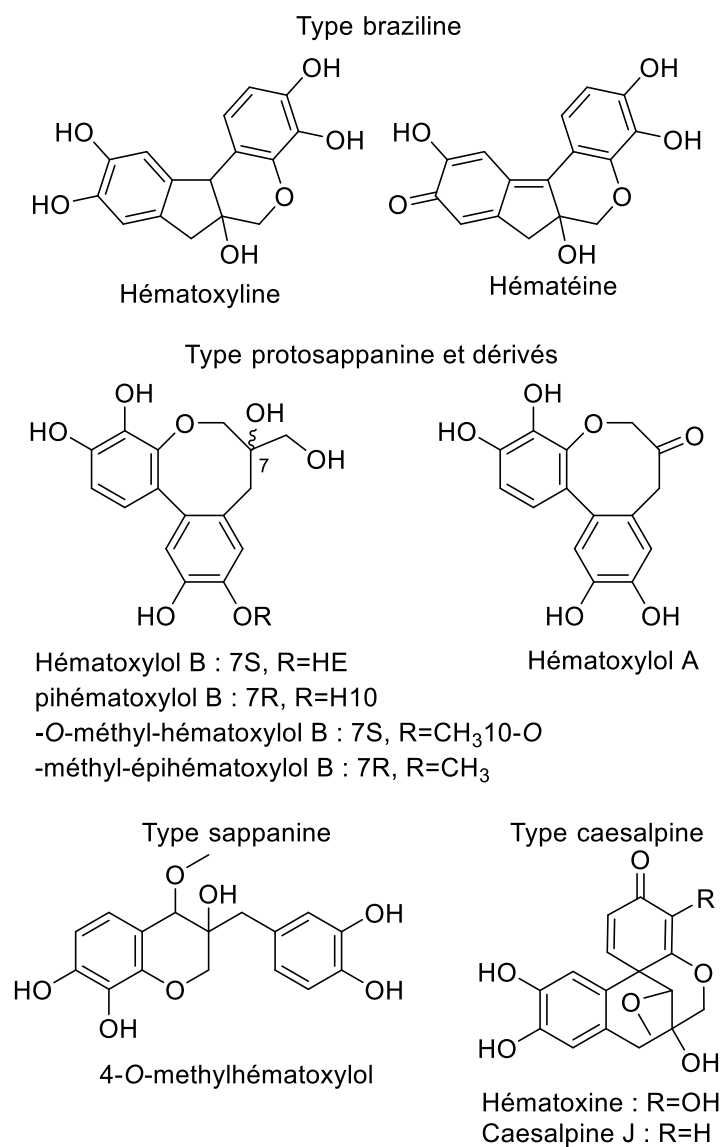


**Figure IV-2 :** Structure des homoisoflavonoïdes du campêche.

Enfin, le 4-O-hématoxylol, un homoisoflavonoïde de type sappanine [423] et la caesalpine J et l'hématoxine, des homoisoflavonoïdes de type caesalpine [423,432], ont aussi été identifiés dans le campêche (Figure IV-2).

### 2. Chalcones et flavonoïdes

Les chalcones décrites dans le campêche sont la sappanchalcone et la déoxysappanchalcone (Figure IV-3) [423]. Plusieurs flavonoïdes ont aussi été identifiés, spécifiquement la quercétine et le kaempférol, ainsi que plusieurs de leurs dérivés glycosylés ; la rhamnétine, l'isorhamnétine, la génistéine, l'astilbine, la 4',5,7-trihydroxy-2'-methoxyflavone et la wogonine (Figure IV-3) [432,433,435,436].

## CHAPITRE IV

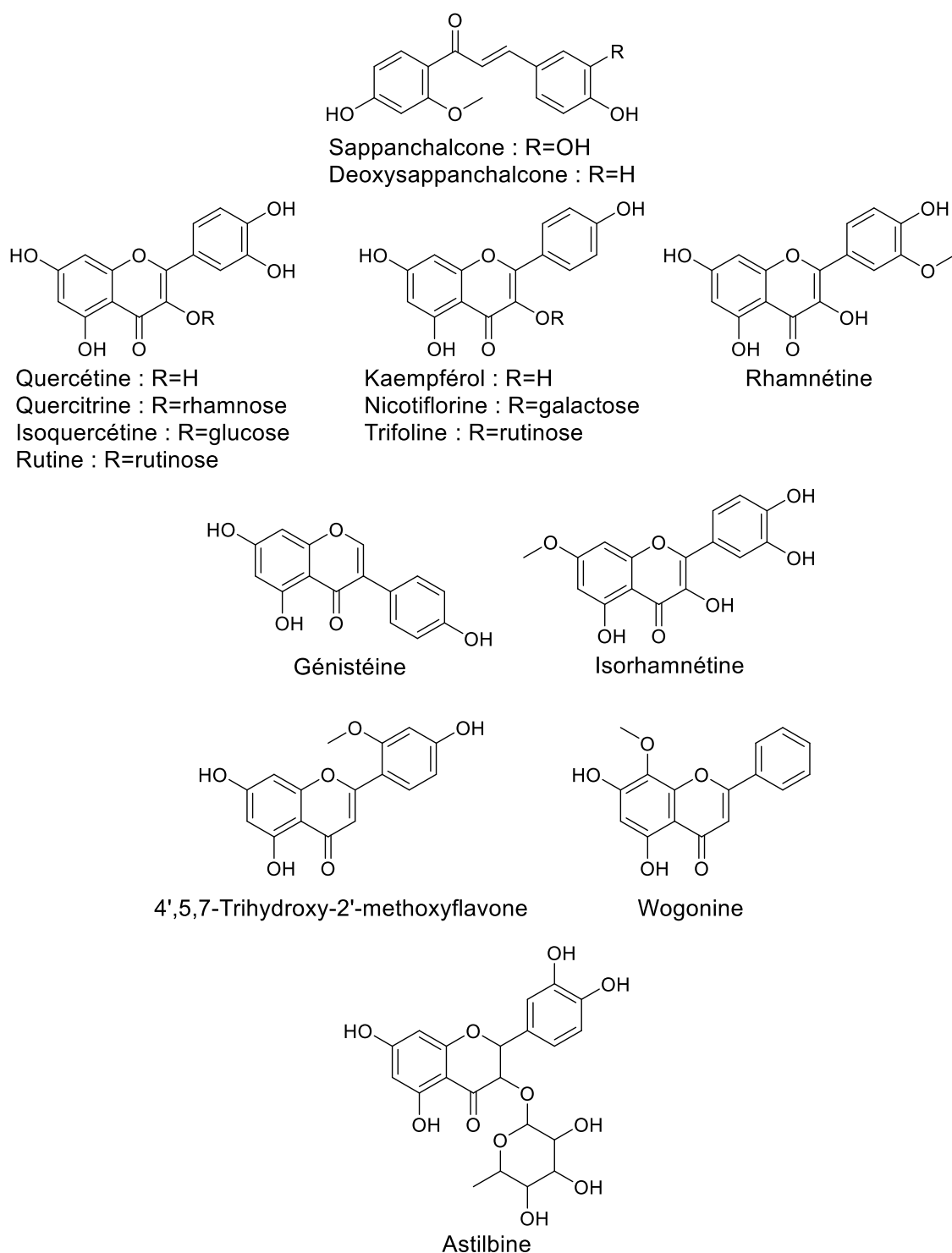


**Figure IV-3** : Structures des chalcones et flavonoïdes du campêche.

### 3. Autres

Les acides ellagique, chlorogénique, férulique, caféique et syringique ont été décrits dans le campêche [433]. De plus, l'acide gallique, le méthyle gallate, l'éthyle gallate et plusieurs gallotanins y ont aussi été identifiés [433,435,436]. Des lignanes ont aussi été décrits, tels que le syringarésinol, le laricirésinol, l'angéoylgomisine P, la gomisine B, la benzoylgomisine P et

## CHAPITRE IV

le 2-(4-hydroxy-2,3-diméthoxyphényle)-5-(3-hydroxypropyle) benzofurane [432]. Enfin, 3 acides gras ont été identifiés dans le bois de campêche, l'acide (E)-13-hydroxy-10-oxooctadéc-11-énoïque, l'acide (9S,10E,12Z,15Z)-hydroxyoctadéca-10,12,15-triénoïque et l'acide (9R,10R,11S, 12Z)-époxy-11-hydroxyoctadéc-12-énoïque [432].

### C. Usages du colorant issu du campêche

Le campêche était utilisé par les civilisations mésoaméricaines comme teinture textile pour colorer les vêtements en violet et en noir, ainsi que comme une encre [421]. La teinture était traditionnellement obtenue par décoction du bois dans l'eau bouillante afin d'extraire l'hématoxyline, puis en laissant la solution s'oxyder à l'air libre [421]. Rapportée par les conquistadors au début du XVI<sup>e</sup> siècle, la teinture à base de campêche s'est répandue dans toute l'Europe. Cependant, un décret interdisant son utilisation en Angleterre a été passé en 1581 en raison de la faible stabilité de sa couleur. Il a été annulé un siècle plus tard suite à la mise au point d'un procédé de mordantage par les teinturiers anglais [421,422]. Le campêche permet d'obtenir différentes couleurs allant du rouge au noir en passant par le bleu et le violet. Il a notamment été utilisé pour teindre en bleu les uniformes de l'armée américaine pendant la guerre de Sécession et les deux Guerres mondiales [421].

Le campêche est la source de l'hématoxyline, l'un des colorants histologiques les plus anciens et les plus utilisés. L'hématoxyline est en effet utilisée depuis le XIX<sup>e</sup> siècle pour colorer les noyaux cellulaires et autres éléments basophiles (composés acides et anioniques comme l'ADN et l'ARN) en bleu violet. Elle est principalement utilisée conjointement avec l'éosine, qui colore en rouge les cytoplasmes et les éléments cellulaires acidophiles, dans la coloration hématoxyline-éosine, communément appelée H&E [421,422,437].

Bien que le colorant du campêche soit souvent appelé hématoxyline (CI 75290), celle-ci est totalement incolore. C'est en réalité l'hématéine, obtenue après l'oxydation de l'hématoxyline, qui est responsable de la couleur rouge-violet de l'extrait [421].

### III. Extraction assistée par ultrasons

L'hématoxyline et l'hématéine étant des composés hydrosolubles [438], leur extraction n'a pas nécessité le développement d'une méthode spécifique. L'extraction assistée par ultrasons a été choisie car c'est une méthode d'éco-extraction efficace et accessible à l'échelle du laboratoire comme à l'échelle industrielle. La composition phytochimique du duramen de

## CHAPITRE IV

campêche étant peu connue, plusieurs solvants de polarités différentes ont été comparés. Cela afin de vérifier si l'eau permet d'extraire non seulement les composés cibles, mais également les autres molécules de la plante.

### A. Comparaison de différents solvants

L'extraction assistée par ultrasons du duramen de campêche a été réalisée dans un bain à ultrasons opérant à une fréquence de 40 kHz pendant 30 min à 40°C avec 1 g de campêche pour 20 mL de solvant (Annexe 2). Trois solvants de polarités différentes, l'eau, l'éthanol et l'acétate d'éthyle, ont été choisis afin de pouvoir observer la totalité des composés du campêche et de déterminer si l'eau est effectivement un solvant adapté pour l'extraction des homoisoflavonoïdes, mais également des autres composés du campêche. Pour cela, le rendement d'extraction et le spectre d'absorption dans le visible (300-650 nm) des extraits obtenus avec les trois solvants ont été comparés.

Le rendement d'extraction le plus élevé a été obtenu avec l'éthanol (11,4%), suivi de l'eau (8,7%) et de l'acétate d'éthyle (6,0%). Les trois extraits ont des spectres d'absorption similaires, avec un pic d'absorption entre 440 et 445 nm selon le solvant (Figure IV-4), ce qui correspond au  $\lambda_{\text{max}}$  de l'hématéine [438].

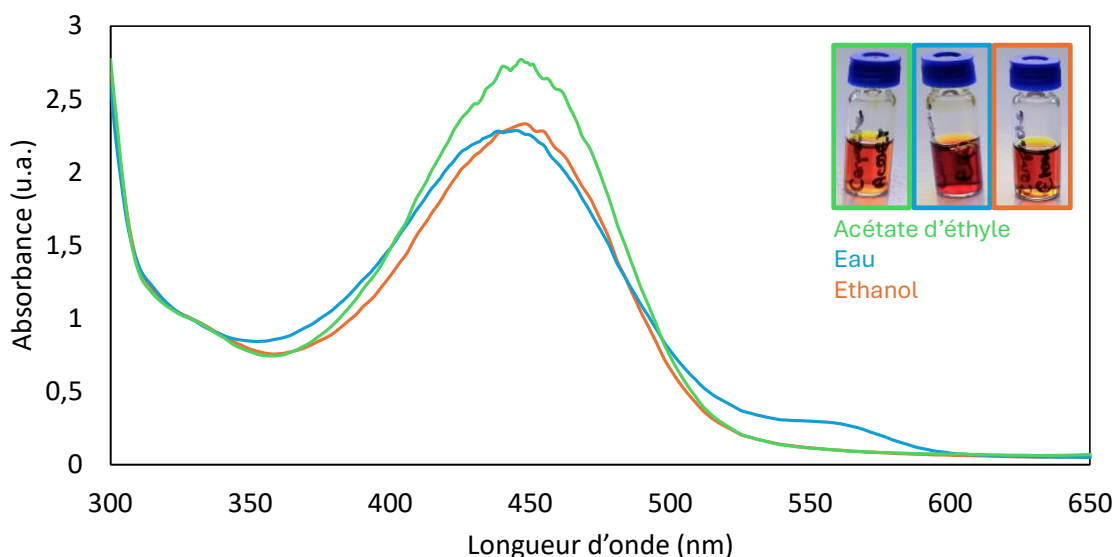


**Figure IV-4 :** Spectre d'absorbance (300-650 nm) et photographie des extraits de campêche obtenus avec l'acétate d'éthyle (vert), l'eau (bleu) et l'éthanol (orange).

Les extraits éthanol et eau ont une absorbance similaire à 440 nm, correspondant à l'hématéine sous sa forme neutre, mais le pic à 555 nm montre que l'extrait eau contient en plus de l'hématéine sous forme ionisée. (Figure IV-4) [425]. La présence de ce composé rend

## CHAPITRE IV

l'extrait eau plus foncé que les deux autres, bien que l'extrait acétate d'éthyle possède l'absorbance à 440 nm la plus élevée (Figure IV-4).

D'après ces résultats, l'eau permet d'obtenir un rendement intermédiaire et une couleur plus intense par rapport aux deux autres solvants. Elle semble donc être le meilleur solvant testé pour l'extraction de l'hématéine et un solvant approprié pour l'extraction globale des composés du campêche.

L'extraction et l'isolement des homoisoflavonoïdes du campêche sont généralement réalisés par des macérations durant plusieurs jours. Li-Gen *et al.* ont décrit une macération en 3 cycles successifs de 3 jours chacun dans l'éthanol (volume et température non communiqués) et obtenu un rendement d'extraction de 5,7% (274 mg d'extrait/4,8 kg de plante) [432]. Escobar-Ramos *et al.* ont réalisé une macération de 24 h à température ambiante dans le méthanol 50% (14 L/7,5 kg de plante) et obtenu un rendement de 4% (300 mg d'extrait pour 7,5 kg de plante) [423]. La méthode d'extraction assistée par ultrasons décrite ici permet d'obtenir un meilleur rendement que les méthodes de la littérature dans les solvants organiques, en 30 min d'extraction au lieu de dizaines d'heures. La rapidité de la méthode permet d'éviter la dégradation de l'hématéine et des potentielles autres molécules colorées durant le procédé d'extraction.

### B. Profil chromatographique des trois extraits

Afin de vérifier si l'éthanol et l'acétate d'éthyle permettent d'accéder à des composés que l'eau ne peut pas extraire, les profils chromatographiques (HPLC-DAD-DEDL) des extraits obtenus avec les trois solvants séchés et repris à 5 mg/mL ont été comparés (méthode en Annexe 6) (Figure IV-5).

Les trois extraits ont un profil chromatographique proche, indiquant qu'ils contiennent les mêmes molécules, dans des proportions relatives différentes. D'après ces résultats, l'échantillon de campêche étudié ne contient pas de composés apolaires nécessitant l'utilisation d'un solvant organique comme l'éthanol ou l'acétate d'éthyle.

Les extraits de campêche contiennent trois composés majoritaires en DEDL, élués à 5,20 min, 7,49 min et 9,10 min (Figure IV-5). Ces trois pics sont plus intenses dans l'extrait eau que dans les deux autres extraits. L'injection d'un standard d'hématoxyline, le précurseur de l'hématéine, a permis d'attribuer le pic élué à 5,20 min à l'hématoxyline. L'hématoxyline

## CHAPITRE IV

s'oxyde très rapidement en hémateïne en solution. La présence d'un pic d'hématoxyline indique qu'elle a pu être solubilisée, mais aussi qu'elle n'a pas été entièrement dégradée durant le procédé d'extraction.

Dans le chromatogramme à 450 nm, on observe un composé principalement responsable de la couleur de l'extrait, élué à 8,96 min (Figure IV-5). Le spectre d'absorption de ce composé correspond à celui de l'hémateïne, le principal colorant du bois de campêche [438]. Son intensité est comparable dans les trois extraits, mais on observe une élévation de la ligne de base autour de ce pic dans l'extrait eau, qui pourrait correspondre à la présence d'isomères ou d'autres molécules proches de l'hémateïne (Figure IV-5).

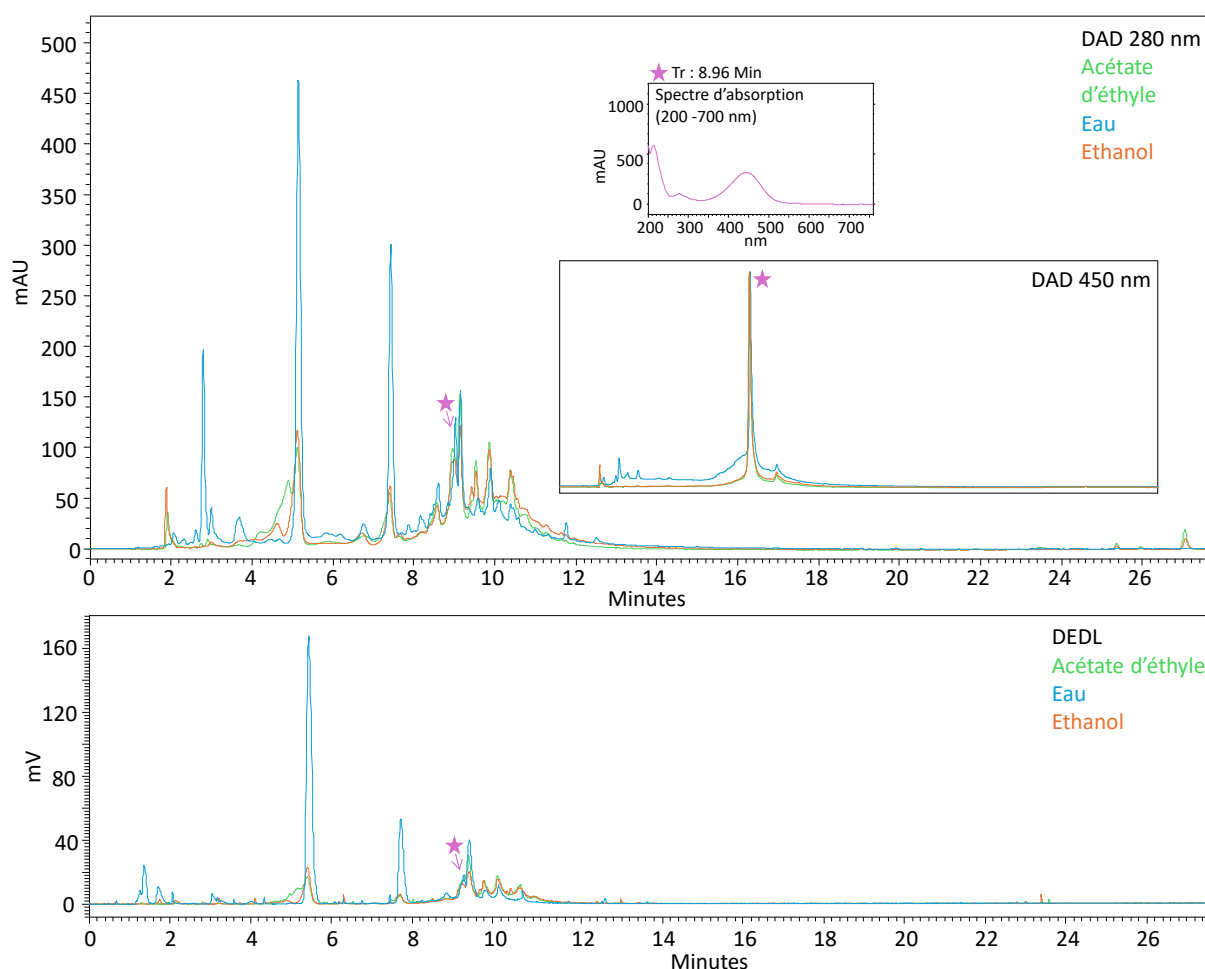


**Figure IV-5 :** Chromatogrammes HPLC-DAD-DEDL des trois extraits de campêche. En vert l'extrait acétate d'éthyle, en bleu l'extrait eau et en orange l'extrait éthanol. Les chromatogrammes à 280 nm et 450 nm sont affichés en haut et les chromatogrammes DEDL sont affichés en bas. La molécule suspectée d'être l'hémateïne est marquée par une étoile violette sur les chromatogrammes et son spectre d'absorption (200-700 nm) est inclus.

## CHAPITRE IV

De plus, certains composés qui absorbent à 280 et 450 nm, élués entre 3 et 4 min ne sont présents que dans l'extrait eau (Figure IV-5). L'eau semble ainsi être le solvant le plus adapté parmi les trois qui ont été comparés pour extraire le colorant du duramen de campêche.

Les profils obtenus en DEDL et en UV sont quasiment identiques, avec peu de composés élués dans le temps mort. Cela indique que les extraits de campêche contiennent peu de métabolites primaires de type sucres et acides aminés, qui sont pourtant généralement majoritaires dans les extraits aqueux en raison de leur hydrosolubilité. Ainsi, les extraits devraient contenir une grande proportion de composés d'intérêt tels que les homoisoflavonoïdes ou d'autres composés phénoliques.

### IV. Composition de l'extrait aqueux

Différentes analyses ont été utilisées pour approfondir la connaissance de l'extrait aqueux de campêche. En premier lieu, la chromatographie sur couche mince haute performance (HR-CCM) a été utilisée afin de vérifier les hypothèses émises précédemment. Les composés phénoliques totaux et l'hématéine ont ensuite été dosés afin de connaître la teneur en composés d'intérêt de l'extrait. Enfin, une analyse UHPLC-HRMS/MS a permis d'identifier les principales molécules présentes dans l'extrait.

#### A. Détection des sucres et acides aminés par HR-CCM

D'après le profil chromatographique, une faible quantité de sucres et d'acides aminés est attendue dans l'extrait de campêche. L'HR-CCM a été utilisée afin de détecter rapidement leur présence éventuelle (méthode en Annexe 5).

Les acides aminés ont été révélés par de la ninhydrine, un réactif qui révèle les acides aminés en rouge-violet ou rouge-marron, excepté la proline qui donne du jaune [439]. Les sucres ont été révélés en violet par le réactif de Molisch. Les deux révélations ont pu être réalisées sur la même plaque, en commençant par les acides aminés car la ninhydrine n'est pas destructrice, contrairement au réactif de Molisch qui contient de l'acide sulfurique (Figure IV-6).

## CHAPITRE IV

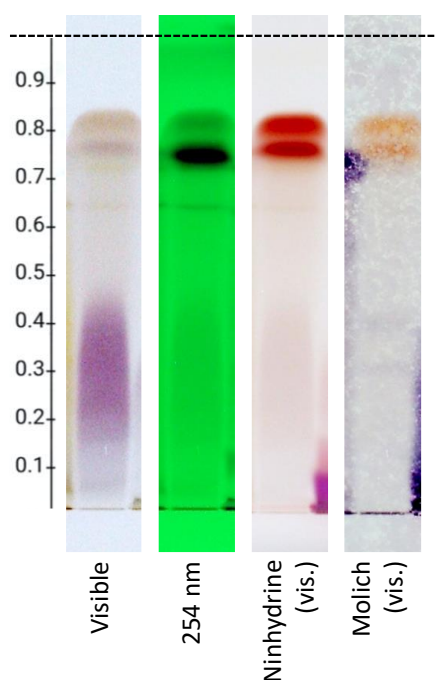


**Figure IV-6:** Séparation et révélation des acides aminés et des sucres par HR-CCM. Eluant : acétonitrile/eau (75/25), plaque observée dans le visible et à 254 nm, et après révélation par la ninhydrine (acides aminés) et le réactif de molisch (sucres) dans le visible. Les fronts de solvants sont représentés par une ligne noire discontinue. La phase stationnaire est une plaque de silice gel60 F<sub>254</sub>.

Trois bandes peuvent être observées dans le visible aux Rf 0,3, 0,75 et 0,81, ces deux dernières absorbant aussi à 254 nm. La bande éluée à Rf = 0,3 correspond probablement à l'hématéine présente dans le colorant. Le réactif à la ninhydrine a révélé les deux autres bandes en rouge, ce qui indique qu'ils portent probablement un groupement amine (Figure IV-6). L'identification de ces composés n'a pas pu être réalisée. Cependant, il ne s'agit pas d'acides aminés, puisque ceux-ci n'absorbent pas dans le visible.

Le réactif de Molisch n'a pas révélé de bande franche pouvant correspondre à des sucres. Deux bandes de très faible intensité semblent cependant présentes aux Rf 0,30 et 0,40. Parmi les standards de sucres analysés dans les mêmes conditions et présentés dans le chapitre précédent, on retrouve le maltotriose (Rf = 0,29), ainsi que le glucose et le mannose, deux monosaccharides (Rf = 0,47). Les deux bandes détectées dans le campêche pourraient donc correspondre à un disaccharide et à un trisaccharide.

Les analyses par chromatographie sur couche mince haute performance ont donc permis de confirmer l'hypothèse d'une faible quantité de métabolites primaires polaires présents dans l'extrait de campêche.

### B. Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des composés phénoliques totaux de l'extrait aqueux de campêche a été réalisé selon la méthode de Folin-Ciocalteu sur plaque 96 puits dans les conditions décrites par Grigoras *et al.* (Annexe 4) [322]. Les données d'absorbance obtenues à 760 nm après 2 h d'incubation avec le réactif de Folin-Ciocalteu en milieu basique ont permis d'obtenir une droite d'étalonnage de l'acide gallique d'équation  $y = 30,922x - 0,0303$  avec un  $R^2$  de 0,997. Celle-ci a été utilisée pour calculer la teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait de campêche.

L'extrait aqueux de campêche a été séché après extraction et repris à 5 mg/mL dans l'eau ultrapure, ce qui correspond à une concentration de 0,5 mg/mL dans le puits. L'absorbance moyenne mesurée à 760 nm ( $Abs_{\text{extrait}}$ ) après la réaction est  $1,196 \pm 0,076$  u.a., tandis que l'absorbance moyenne de l'extrait sans le réactif ( $Abs_{\text{blanc}}$ ) est de  $0,046 \pm 0,001$  u.a., ce qui montre que la couleur de l'extrait a un impact négligeable sur le résultat du test.

La teneur en composés phénoliques totaux a été calculée à  $0,382 \pm 0,025$  mg eq. acide gallique/mL d'extrait dans le puits, soit  $76,34 \pm 4,95$  mg eq. acide gallique/g d'extrait sec. D'après ces résultats, il y a environ 7,5% de composés phénoliques dans l'extrait, ce qui est, par exemple, plus de 3 fois supérieur au résultat obtenu pour la garance des teinturiers. Or, l'extrait de garance était très riche en sucres, alors que l'extrait de campêche en est pratiquement exempt. Ce résultat semble confirmer l'hypothèse d'une grande richesse en composés phénoliques, des molécules généralement reconnues pour leur potentiel cosmétique [424].

### C. Etude du colorant

#### 1. Dosage de l'hématéine

La concentration en hématéine dans l'extrait aqueux de campêche a été mesurée à partir de la loi de Beer-Lambert. L'extrait aqueux de campêche a été séché sous flux d'azote puis repris à 0,25 mg/mL dans l'eau distillée. Le pH de cette solution étant légèrement acide, l'hématéine ( $pK_a = 6,7$ ) y est présente sous forme neutre (Hn), mais aussi sous forme anionique ( $Hn^-$ ) (Figure IV-7) [440].

## CHAPITRE IV

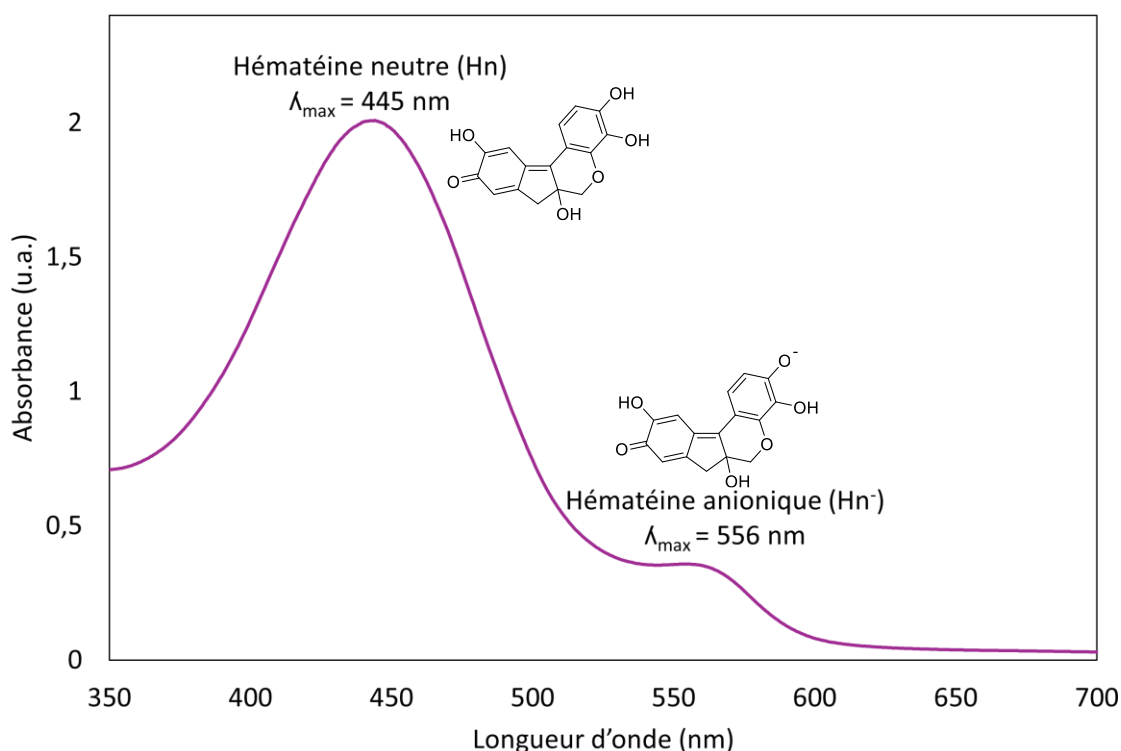


**Figure IV-7 :** Spectre d'absorption de l'extract de campêche (350-700 nm). Les deux bandes d'absorption correspondent à la forme neutre (Hn) et à la forme anionique de l'hématéine (Hn<sup>-</sup>).

Bettinger et Zimmermann ont déterminé les coefficients d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) dans l'eau de l'hématéine neutre et de l'hématéine anionique à leurs maxima d'absorbance respectifs :  $\lambda_{\max} = 445 \text{ nm}$  (Hn) et  $556 \text{ nm}$  (Hn<sup>-</sup>) (Tableau IV-2) [440].

**Tableau IV-2 :** Coefficients d'extinction molaires de l'hématéine dans l'eau déterminés par Bettinger et Zimmermann [440].

| Forme           | $\epsilon$ (445 nm, eau)                              | $\epsilon$ (556 nm, eau)                              |
|-----------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Hn              | $3,36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ | $2,10 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ |
| Hn <sup>-</sup> | $7,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  | $5,83 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ |

A partir de ces données, la concentration totale en hématéine (Hn + Hn<sup>-</sup>) a été calculée à partir de la loi d'additivité, d'après laquelle l'absorbance d'un mélange à une longueur d'onde donnée correspond à la somme des absorbances de chaque composant du mélange à cette longueur d'onde (Equation IV-1 A). Ainsi pour l'hématéine, l'absorbance à 445 nm et l'absorbance à 556 nm correspondent chacune à la somme de l'absorbance de Hn et Hn<sup>-</sup> à ces longueurs d'onde (Equation IV-1 B). On obtient donc un système de deux équations à double inconnue dont la résolution permet d'obtenir la concentration dans l'extract des deux formes d'hématéine.

## CHAPITRE IV

$$A \text{ à une longueur d'onde } (\lambda) \text{ donnée : } A^\lambda = \sum_i A_i^\lambda = \sum_i (\varepsilon_i^\lambda \times \ell \times C_i) \quad (\text{IV-1 A})$$

Avec A : absorbance (u.a.),  $\ell$  : chemin optique (1 cm),  $\varepsilon$  : coefficient d'extinction molaire ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) et C : concentration (M)

$$A^{445 \text{ nm}} = A_{Hn}^{445 \text{ nm}} + A_{Hn^-}^{445 \text{ nm}} = (\varepsilon_{Hn}^{445 \text{ nm}} \times \ell \times C_{Hn}) + (\varepsilon_{Hn^-}^{445 \text{ nm}} \times \ell \times C_{Hn^-}) \quad (\text{IV-1 B})$$

$$A^{556 \text{ nm}} = A_{Hn}^{556 \text{ nm}} + A_{Hn^-}^{556 \text{ nm}} = (\varepsilon_{Hn}^{556 \text{ nm}} \times \ell \times C_{Hn}) + (\varepsilon_{Hn^-}^{556 \text{ nm}} \times \ell \times C_{Hn^-})$$

Les absorbances mesurées pour l'extrait de campêche à 0,25 mg/mL à 445 nm et 556 nm sont 2,004 et 0,358 respectivement. D'après le calcul décrit précédemment, la concentration en hémateïne neutre est égale à  $5,88 \cdot 10^{-5}$  M, et la concentration en hémateïne anionique est égale à  $4,02 \cdot 10^{-6}$  M. La concentration totale en hémateïne est donc de  $6,282 \cdot 10^{-5}$  M, soit 0,0188 mg/mL (masse molaire = 300,26 g/mol) ou 75,5 mg/g d'extrait sec. Il y a donc environ 7,5% d'hémateïne dans l'extrait sec.

### 2. Effet du pH sur la couleur de l'extrait

Afin d'observer la variation de la couleur et du spectre d'absorption de l'extrait aqueux de campêche, celui-ci a été dilué par 10 dans quatre tampons différents dont le pH varie de 5 à 8 (détails en Annexe 4) (Figure IV-8).

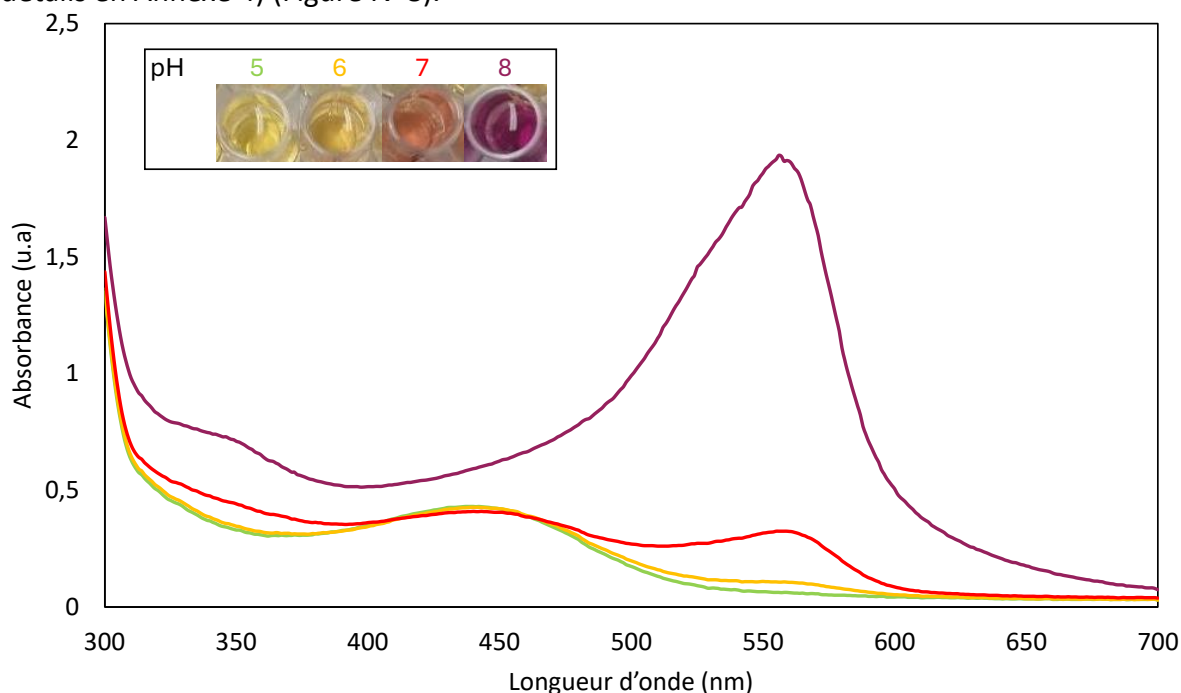


**Figure IV-8 :** Spectres d'absorbance et photographie des puits correspondant à l'extrait aqueux de campêche dilué par 10 dans des tampons à pH 5 (vert), 6 (jaune), 7 (rouge) et 8 (violet).

A pH 5 et à pH 6, l'extrait est jaune, avec un maximum d'absorption à 440 nm correspondant à la forme neutre de l'hémateïne. A pH 6, le pic d'absorption à 556 nm correspondant à la

## CHAPITRE IV

forme ionisée de l'hématéine commence à apparaître. A pH 7, le pH est proche du pKa, on retrouve donc les deux formes de l'hématéine à l'équilibre, correspondant à un extrait orange. A pH 8, la forme ionisée de l'hématéine devient majoritaire et l'extrait est alors violet (Figure IV-8). Ces conclusions concordent avec les descriptions de la littérature concernant le comportement de l'hématéine à différents pH [425,440]. Dans la littérature, le pic d'absorption à 556 nm est cependant plus intense que celui à 440 nm à pH 7 alors que sur le spectre de l'extrait, on observe deux pics d'intensité équivalente [425,440]. Cette différence pourrait provenir de la complexité de l'extrait par rapport au standard utilisé dans ces études et de la contribution de l'absorbance d'autres molécules à 440 nm.

### D. Analyse UHPLC-DAD-HRMS/MS

Les profils chromatographiques obtenus en UHPLC-DAD-HRMS/MS à 280 nm et 450 nm correspondent à ceux observés en HPLC-DAD-DEDL et présentent deux pics majoritaires absorbant à 280 nm et un composé absorbant à 440 nm (Figure IV-9). L'identification a été concentrée sur ces trois composés. supposés être l'hématoxyline et l'hématéine, les deux marqueurs du campêche, et une autre molécule non identifiée [434]. L'UHPLC-HRMS/MS a été utilisée afin de confirmer l'identification de l'hématoxyline et de l'hématéine et de proposer une hypothèse d'identification pour la molécule inconnue.

Les chromatogrammes obtenus en MS<sup>-</sup>, MS<sup>+</sup> et à 280 et 440 nm sont affichés dans la Figure IV-9. Pour les trois composés ciblés, une formule moléculaire a été proposée avec une tolérance de 5 ppm pour la MS et de 10 ppm pour la MS/MS. Les adduits [M+Na]<sup>+</sup> et la comparaison des données obtenues en ionisation positive et négative ont été utilisées pour corroborer les formules moléculaires. Pour le composé inconnu, celle-ci a ensuite été soumise à des bases de données publiques (SciFinder, KNapSack et Pubchem) et comparée à la littérature afin de suggérer une hypothèse d'identification. Pour l'hématéine et l'hématoxyline, les formules moléculaires, les  $\lambda_{\max}$  et le spectre de fragmentation ont été comparées à la littérature afin d'appuyer leur identification.

L'identification des autres composés détectés en ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup> s'est avérée difficile de par leur proximité structurale. En effet, de nombreux composés détectés présentent un  $m/z$  identique pouvant correspondre à plusieurs homoisoflavonoïdes et ont un spectre de fragmentation similaire voire identique, mais des temps de rétention différents. De plus, le signal correspondant à l'hématéine est détecté continuellement entre 3,5 et 10 min et cause un bruit

## CHAPITRE IV

de fond qui masque les autres composés. Enfin, les homoisoflavonoïdes du campêche sont peu décrits dans la littérature. Le fractionnement de l'extrait et la purification de ses composés pourrait permettre leur identification par spectrométrie de masse et par RMN.

## CHAPITRE IV

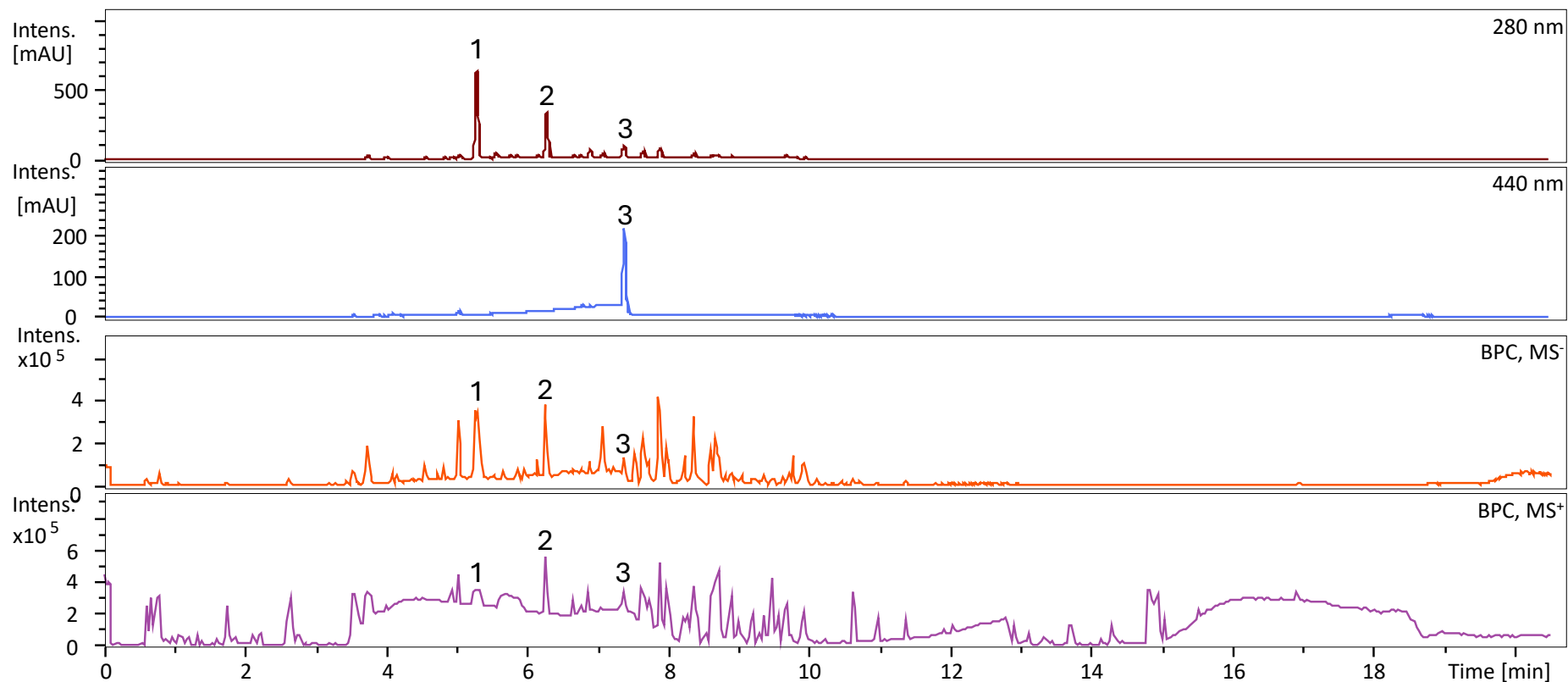


**Figure IV-9 :** Chromatogrammes DAD à 280 nm (marron) et à 440 nm (bleu) et chromatogrammes MS (Base Peak Chromatogram) en mode positif (violet) et négatif (orange).

## CHAPITRE IV

Le composé **1** a été détecté à 5,27 min avec  $\lambda_{\max}$  286 nm. Lors de l'analyse HPLC-DAD-DEDL, il avait été identifié comme étant l'hématoxyline par comparaison avec un standard. Le composé **1** a été détecté à  $m/z$  301,0712 en  $MS^-$  et 303,0863 en  $MS^+$ , ce qui correspond à la formule proposée  $C_{16}H_{14}O_6$ , qui est bien la formule brute de l'hématoxyline. Plusieurs fragments caractéristiques de l'hématoxyline ont aussi été détectés à  $m/z$  283,0593 ( $[M-H_2O]^-$ ), 179,0343 ( $C_9H_7O_4^-$ ), 151,0407 ( $C_8H_7O_3^-$ ), 137,0230 ( $C_7H_5O_3^-$ ) et 109,0279 ( $C_6H_5O_2^-$ ) [26]. Ces résultats corroborent l'identification de l'hématoxyline.

Le composé **2** a été détecté à 6,26 min avec  $\lambda_{\max}$  254, 291 nm. Le composé **2** a été détecté à  $m/z$  319,0819 en  $MS^-$  et la formule  $C_{16}H_{16}O_7$  lui a été attribuée. Cette formule associée à ce spectre d'absorption pourrait correspondre à l'hématoxylol B, un homoisflavonoïde de type protosappanine précédemment décrit dans le campêche [432]. Le spectre de fragmentation de l'hématoxylol B n'a pas été retrouvé dans la littérature. Cependant, la protosappanine B possède une structure très similaire avec seulement un groupement hydroxyle de moins que l'hématoxylol B et son spectre de fragmentation a été décrit à plusieurs reprises (Figure IV-10). Les principaux fragments décrits dans la protosappanine B sont la perte de  $C_2H_4O_2$  (60 u) et de  $C_3H_4O_2$  (72 u) (Figure IV-10) [26,441]. Ces deux pertes ont été détectées pour le composé **2** à  $m/z$  259,0593 et 247,0571, indiquant que le composé **2** pourrait effectivement être l'hématoxylol B ou un dérivé d'homoisflavonoïde de type protosappanine. D'autres fragments ont été détectés à  $m/z$  301,0702 et 283,0638 (après la perte consécutive de deux groupements hydroxyles).

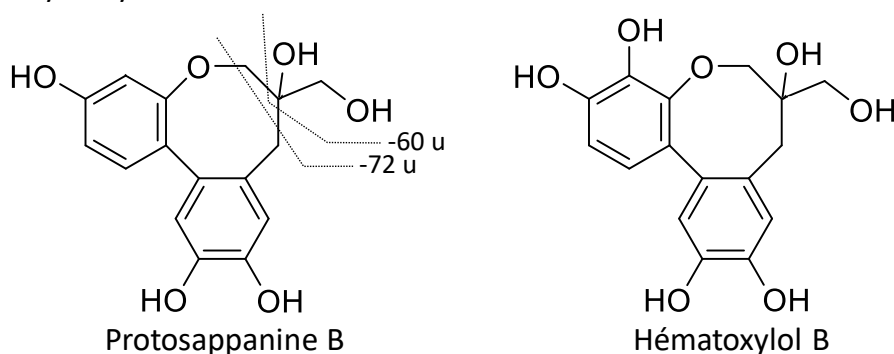


**Figure IV-10** : Structures de la protosappanine B et de l'hématoxylol B et principales fragmentations de la protosappanine B d'après [26].

Le composé **3** a été détecté à 7,37 min avec  $\lambda_{\max}$  287, 443 nm, à  $m/z$  299,0555 en  $MS^-$  et 301,0634 en  $MS^+$ . La formule proposée pour ce composé est  $C_{16}H_{12}O_6$ , ce qui correspond, ainsi que le spectre d'absorption, à l'hématéine. Le spectre de fragmentation en  $MS^-$  correspond

## CHAPITRE IV

aux descriptions de la littérature avec des fragments détectés à  $m/z$  253,0493 ( $[M-CH_2O_2]^-$ ), 225,0546 ( $[M-CH_2O_2-CO]^-$ ), 174,0311 ( $C_{10}H_5O_3^-$ ), 145,0283 ( $C_9H_5O_2^-$ ) et 125,0216 ( $C_6H_5O_3^-$ ) [26]. Le fragment correspondant à la perte d'un hydroxyle, décrit dans la littérature, n'a pas été détecté en  $MS^-$ , mais il a bien été détecté en  $MS^+$  à  $m/z$  283,0594. Ces résultats semblent confirmer l'identification de l'hématéine pour le composé **3**.

L'identification des autres molécules de l'extrait de campêche n'ayant pas pu être finalisée, il serait intéressant de les isoler afin de pouvoir les caractériser, puisque la littérature au sujet du profil phytochimique du campêche est peu fournie [26].

### V. Stabilité de la couleur de l'extrait

Lors des différentes analyses présentées précédemment, l'évolution rapide de la couleur de l'extrait vers une couleur plus terne a été remarquée. L'analyse HRMS d'un extrait frais et du même extrait un jour après son extraction montre une diminution importante de l'intensité l'ion  $m/z$  301,0634 (correspondant à l'hématéine) en  $MS^+$ , ainsi qu'une diminution de l'intensité du pic correspondant sur le chromatogramme UV à 450 nm (Figure IV-11).

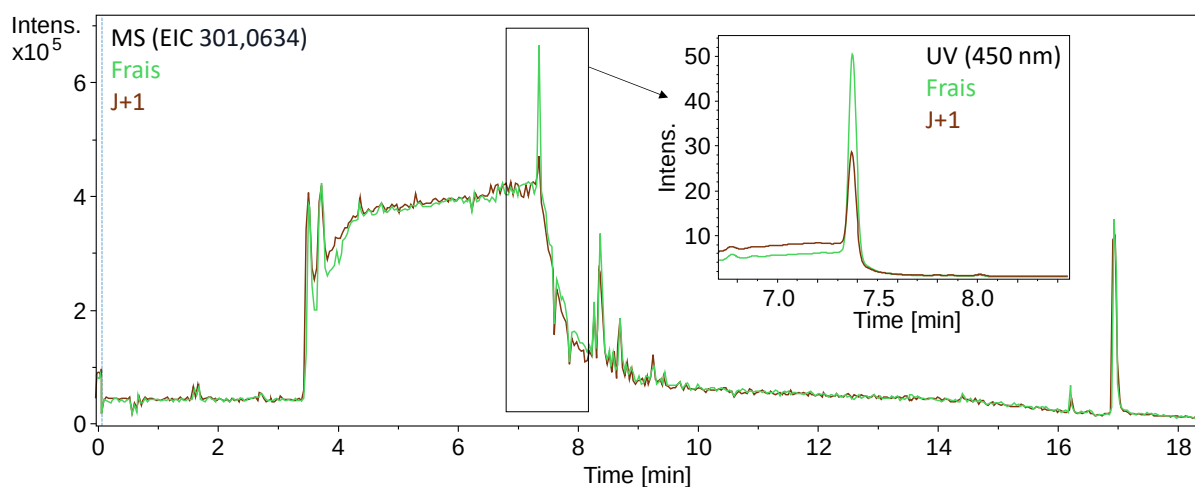


**Figure IV-11 :** Chromatogrammes correspondant à l'extraction de l'ion 301,0634 en  $MS^+$  et chromatogrammes UV à 450 nm dans la zone d'intérêt pour l'extrait frais (vert) et le même extrait analysé J+1 (marron).

À la suite de cela, la stabilité de l'extrait a été suivie dans différentes conditions afin de vérifier l'impact de la méthode et du solvant d'extraction sur l'extrait. En effet, si la comparaison des solvants d'extraction a permis de confirmer que l'eau est un solvant efficace pour l'extraction du colorant du campêche, la dégradation de l'hématéine dans l'eau a été décrite comme étant particulièrement rapide, ce qui pourrait empêcher la valorisation cosmétique de l'extrait [438]. La stabilité dans le temps des extraits obtenus avec les trois solvants (eau, éthanol,

## CHAPITRE IV

acétate d'éthyle) a donc été évaluée afin d'observer si l'eau impacte particulièrement la stabilité de l'hématéine par rapport aux deux autres solvants. De plus, une extraction sous agitation à la même température que l'UAE (40°C) à l'eau a été réalisée afin de vérifier que l'extraction assistée par ultrasons n'accélère pas l'oxydation du colorant.

### A. Stabilité dans les trois solvants d'extraction

Les extraits obtenus avec l'eau, l'éthanol et l'acétate d'éthyle ont été séchés, puis solubilisés à 0,5 mg/mL dans leur solvant d'extraction respectif. Leur spectre d'absorption entre 300 et 600 nm a été mesuré immédiatement après la solubilisation (J0), ainsi que deux jours plus tard (J2) pour observer la dégradation dans un temps relativement court et 48 jours plus tard (J48) afin de suivre la dégradation sur un plus long terme (Figure IV-12).

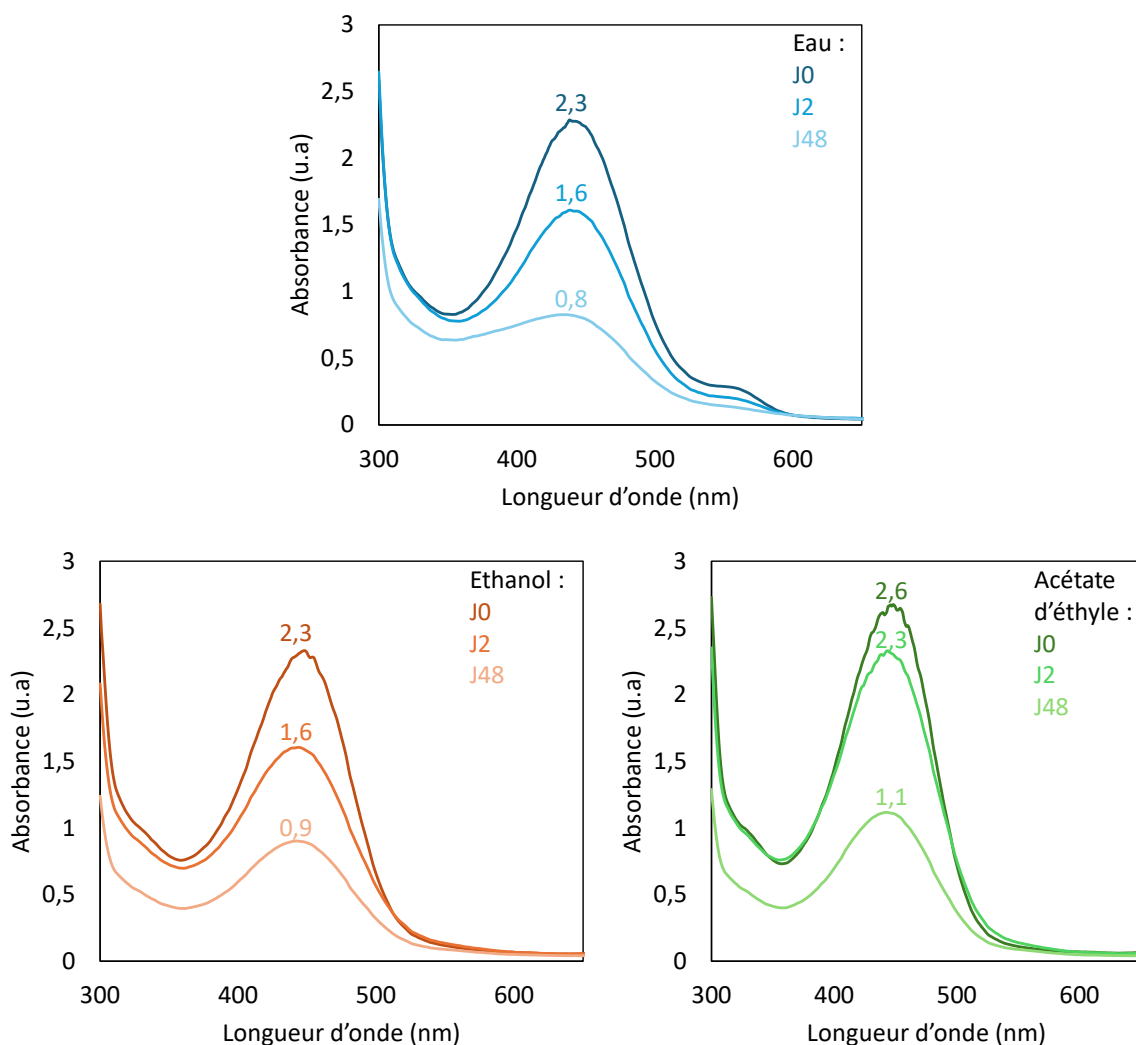


**Figure IV-12:** Spectre d'absorption (300-600 nm) et absorbance au  $\lambda_{max}$  (440 nm) des extraits eau (bleu), éthanol (orange) et acétate d'éthyle (vert) à J0, J2 et J48.

## CHAPITRE IV

Les extraits eau et éthanol ont un comportement similaire avec une absorbance à 440 nm qui passe de 2,3 u.a. à 1,6 u.a. après 2 jours, puis à 0,8 ou 0,9 u.a. respectivement après 48 jours (Figure IV-12). L'extrait acétate d'éthyle possède une absorbance légèrement plus élevée à J0 (2,6 u.a.) et subit une perte de 12% durant les deux premiers jours, moins importante que celle des extraits eau et éthanol qui est de 30% (Figure IV-12). Cependant, la perte totale après 48 jours est proche dans les trois extraits, avec respectivement 65%, 61% et 58% de perte d'absorbance à 440 nm pour les extraits eau, éthanol et acétate d'éthyle (Figure IV-12).

D'après ces résultats, la dégradation du colorant est comparable dans l'eau et dans l'éthanol, mais elle y est plus rapide que dans l'acétate d'éthyle. La suite des expérimentations a donc été dédiée à l'amélioration de la stabilité de l'extrait aqueux de campêche, afin de pouvoir l'utiliser par la suite dans des formulations cosmétiques.

### **B. Comparaison de la stabilité en fonction de la méthode d'extraction**

L'extraction assistée par ultrasons permet l'intensification de l'extraction à des températures relativement faibles par rapport aux autres techniques d'extraction (généralement inférieures à 60°C), ce qui rend possible l'extraction des composés thermolabiles. Cependant, les ultrasons peuvent causer la formation de radicaux libres et l'oxydation notamment des composés phénoliques [442]. L'hématéine étant particulièrement sensible à l'oxydation, l'UAE pourrait accélérer sa dégradation. Afin de le vérifier, une extraction sous agitation et une extraction assistée par ultrasons ont été réalisées dans les conditions précédemment décrites, mais dans un volume plus faible (50 mg de campêche/1mL d'eau, 30 min, 40°C). Les deux extractions ont été réalisées en triplicats, puis les extraits ont été séchés afin de calculer le rendement d'extraction. Le rendement obtenu pour l'extraction assistée par ultrasons ( $7,5 \pm 0,7\%$ ) est légèrement plus élevé que celui obtenu sous agitation ( $6,0 \pm 0,9\%$ ). Ce résultat illustre l'intensification de l'extraction permise par les ultrasons, notamment par la destruction des cellules végétales qui facilite la diffusion des molécules de la plante vers le solvant [442].

Les triplicats d'extraction ont ensuite été regroupés et solubilisés à 0,25 mg/mL, puis déposés en triplicats sur une plaque 96 puits. L'absorbance à 440 nm des extraits a alors été mesurée directement après la solubilisation, ainsi qu'après 1h et 2h pour observer la dégradation

## CHAPITRE IV

rapide du colorant et après 89h (4 jours) pour observer la couleur de l'extrait entièrement dégradé (Figure IV-13).

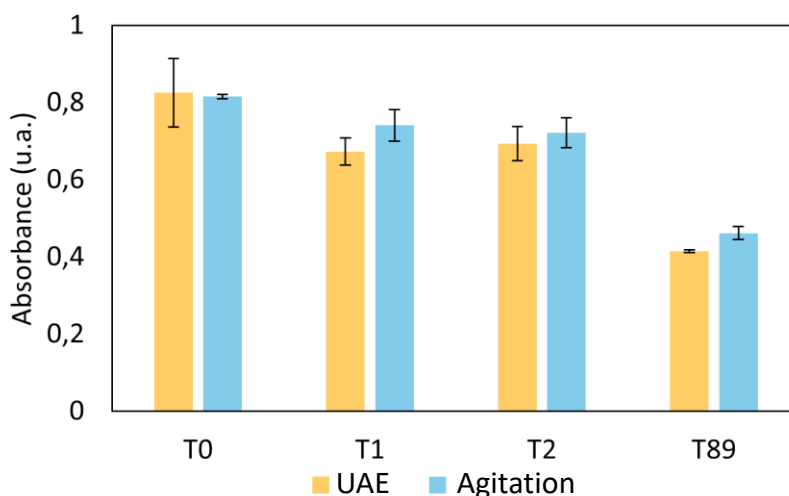


**Figure IV-13** : Evolution de l'absorbance des extraits obtenus par UAE (jaune) et sous agitation (bleu).

L'extrait UAE semble ensuite se dégrader légèrement plus rapidement que le macérât, mais le croisement des barres d'erreurs indique que cette différence n'est pas significative. D'après ces résultats, l'UAE n'a pas un impact important sur la stabilité de l'extrait. Elle a donc été conservée pour la suite des expérimentations.

## VI. Essais de stabilisation pendant l'extraction

Afin de stabiliser le colorant issu du campêche directement lors de l'extraction, plusieurs méthodes ont été employées. La première consiste en une légère acidification du milieu d'extraction afin d'éviter l'ionisation de l'hématéine. La seconde, inspiré par l'utilisation de co-pigments pour la stabilisation des anthocyanes, correspond à l'ajout de divers composés antioxydants. La troisième est l'ajout de cyclodextrines afin d'encapsuler l'hématéine et de la protéger de l'oxydation. Enfin, la dernière méthode est l'extraction par des solvants eutectiques profonds naturels (NaDES), une méthode qui n'est pas une extraction à l'eau à proprement parler, mais qui peut permettre d'améliorer l'efficacité d'extraction et la stabilité des extraits.

Tous ces essais ont été réalisés directement durant l'extraction, en triplicats, en remplaçant l'eau ultrapure par les différentes solutions envisagées. Les conditions d'extraction utilisées sont celles décrites précédemment (UAE, 50 mg/1 mL, 30 min, 40°C). Après l'extraction, les extraits ont été centrifugés puis stockés à l'abri de la lumière et leur absorbance à 440 nm a

## CHAPITRE IV

été mesurée immédiatement ( $T_0$ ) et à différents intervalles notés  $T_x$ ,  $x$  étant le nombre d'heures entre  $T_0$  et la mesure d'absorbance. Afin de réaliser les mesures d'absorbance les extraits ont été dilués par 10 dans leur solvant d'extraction ou dans l'eau, directement dans le puits. L'absorbance à  $T_0$  a été comparée afin d'observer une éventuelle amélioration de l'efficacité de l'extraction ou un impact de l'adjuvant sur la couleur de l'extrait. Pour suivre son évolution, la perte d'absorbance a été calculée par le ratio de l'absorbance à  $T_x$  sur l'absorbance à  $T_0$  exprimée en pourcentage.

### A. Acidification du solvant

Afin de stabiliser le colorant, l'ajout d'acide a été la première technique envisagée. Le contrôle du pH est classiquement utilisé pour stabiliser les colorants végétaux sensibles au pH comme les anthocyanes ou les bétalaïnes [426]. Comme décrit précédemment, l'hématéine est partiellement sous forme déprotonée lors de l'extraction par l'eau ultrapure. Or, la prévention de la déprotonation de la molécule est la principale technique utilisée pour stabiliser la braziléine, un colorant de la même famille que l'hématéine, dont la structure est proche avec seulement un groupement hydroxyle de moins par rapport à l'hématéine [27].

Le  $pK_a$  de l'hématéine étant de 6,7, nous avons sélectionné des solutions de  $pH = 4$  pour que sa forme neutre soit prédominante. L'acide citrique, l'acide sorbique et l'acide ascorbique sont des acides régulièrement utilisés en cosmétique, notamment comme régulateurs de pH et ont donc été sélectionnés [60]. Cependant, lors des essais préliminaires, un éclaircissement de la couleur par rapport à l'extrait eau a été remarqué pour les extraits traités avec les acides citrique et sorbique. Cet effet n'a pas été observé à pH équivalent pour les extraits effectués avec l'acide ascorbique. C'est donc ce dernier qui a été choisi pour la suite, à une concentration de 0,1 mM ( $pH = 4,05$ ) et 1 mM ( $pH = 3,55$ ). De plus, l'acide ascorbique a déjà été décrit comme ayant un effet stabilisant pour les bétalaïnes, d'autres colorants végétaux sensibles au pH et à l'oxydation et est un antioxydant, ce qui pourrait contribuer à l'amélioration de la stabilité de l'hématéine [45,152,426].

L'absorbance à 440 nm des extraits obtenus dans les solutions d'acide ascorbique est légèrement supérieure à celle de l'extrait eau utilisée comme référence (Figure IV-14). Cette différence est probablement due à la plus grande proportion de forme neutre, dont le  $\lambda_{max}$  est à 440 nm par rapport à la forme ionisée dont le  $\lambda_{max}$  est à 556 nm.

## CHAPITRE IV

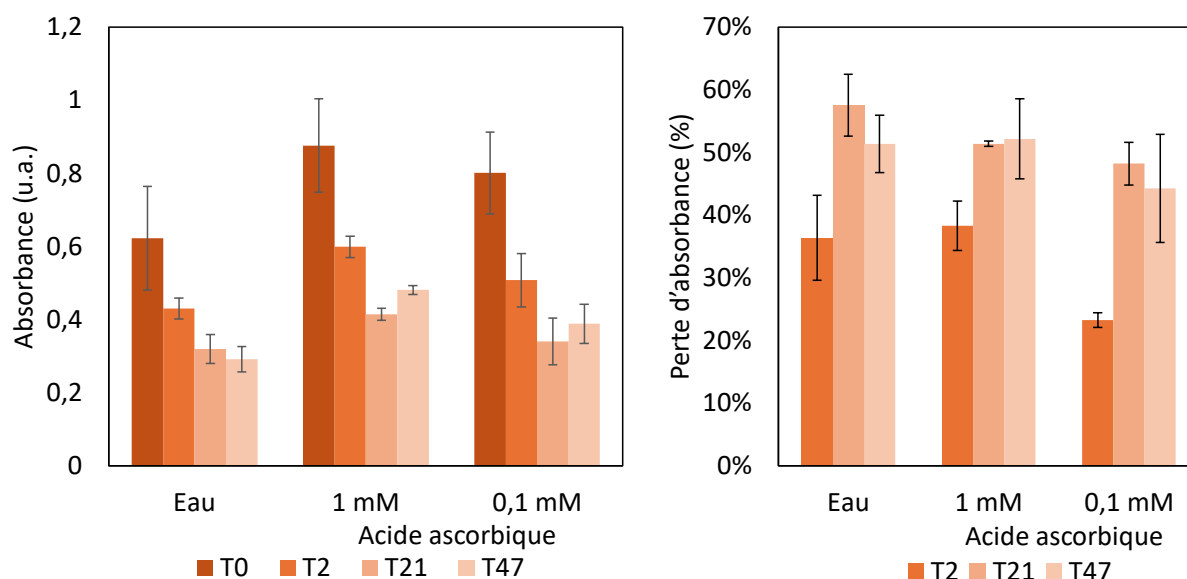


**Figure IV-14 :** Evolution de l'absorbance à 440 nm (à gauche) et de la perte d'absorbance (à droite) des extraits obtenus dans l'eau, l'acide ascorbique à 1 mM et l'acide ascorbique à 0,1 mM à T0 et après 2h (T2), 21 h (T21) et 47h (T47). Toutes les extractions ont été réalisées en triplicats et les extraits ont été déposés en triplicats (n = 3 x 3).

Après 2h à l'abri de la lumière, l'absorbance des extraits eau et acide ascorbique 1 mM a diminué de 30 à 40 %, tandis que celle de l'extrait acide ascorbique 0,1 mM n'a diminué que de 20% (Figure IV-14), ce qui suggère que l'acidification pourrait protéger le colorant de l'oxydation à court terme, mais seulement dans une certaine gamme de pH. Cependant, après 21 h et 47 h, la différence entre les extraits obtenus dans l'eau ou les solutions d'acide ascorbique est très faible, notamment parce que la variabilité entre les triplicats de chaque condition est élevée. Après 47 h, tous les extraits ont perdu approximativement 50% de leur absorbance à 440 nm, ce qui correspond à un éclaircissement visible à l'œil nu. Dans ces conditions, l'extrait n'est donc pas assez stable pour être utilisé en formulation cosmétique.

### B. Ajout de composés antioxydants et co-pigmentation

La deuxième voie envisagée pour éviter l'oxydation de l'hématéine dans l'extrait de campêche est l'ajout de composés décrits à la fois comme des co-pigments utilisés pour la stabilisation des anthocyanes et comme des antioxydants pouvant prévenir l'oxydation du colorant pendant l'extraction. Ngamwonglumlert et Devahastin ont émis l'hypothèse que la co-pigmentation, largement utilisée pour stabiliser les anthocyanes, pourrait être une solution efficace pour la stabilisation de la braziléine [27]. Celle-ci repose sur l'association non covalente entre anthocyanes et co-pigments qui résulte en un complexe stable. Les co-

## CHAPITRE IV

pigments des anthocyanes peuvent être des acides phénoliques, des flavonoïdes, des alcaloïdes ou encore des acides aminés par exemple [22].

Nous avons donc envisagé plusieurs composés phénoliques, incluant trois acides phénoliques, l'acide gallique, l'acide caféique et l'acide chlorogénique, ainsi que deux flavonoïdes, la catéchine et la rutine. Les acides phénoliques choisis possèdent des structures différentes, l'acide gallique étant caractéristique par son groupement galloyl et l'acide caféique par son groupement catéchol, tandis que l'acide chlorogénique est formé à partir de l'acide caféique et de l'acide quinique. Ils sont tous les trois réputés pour leur capacité antioxydante [323] et ont précédemment été décrits dans la stabilisation des anthocyanes [427]. La catéchine et la rutine appartiennent respectivement à la sous-famille des flavanols et des flavonols, qui sont les flavonoïdes à la plus grande capacité antioxydante [323]. Ces deux molécules ont également été utilisées comme des co-pigments des anthocyanes [427].

Tous ces composés étant des métabolites secondaires retrouvés dans de nombreuses plantes, la co-extraction du campêche et d'une plante riche en l'un ou plusieurs de ces composés pourrait avantageusement remplacer l'utilisation d'un standard commercial si cette technique de stabilisation se révèle efficace.

Pour cette méthode de stabilisation, 4 mg de standard ont été ajoutés aux 50 mg de plante avant extraction. Cette méthode a permis de s'affranchir des différences de solubilité des composés testés et de se rapprocher de conditions de coextraction végétale. L'absorbance à 440 nm à T0 des extraits obtenus à l'eau seule ou avec ajout des acides phénoliques est relativement similaire compte tenu de la variabilité (Figure IV-15). Les extraits pour lesquels la rutine ou la catéchine ont été ajoutées ont une absorbance à 440 nm légèrement supérieure aux autres (Figure IV-15).

## CHAPITRE IV

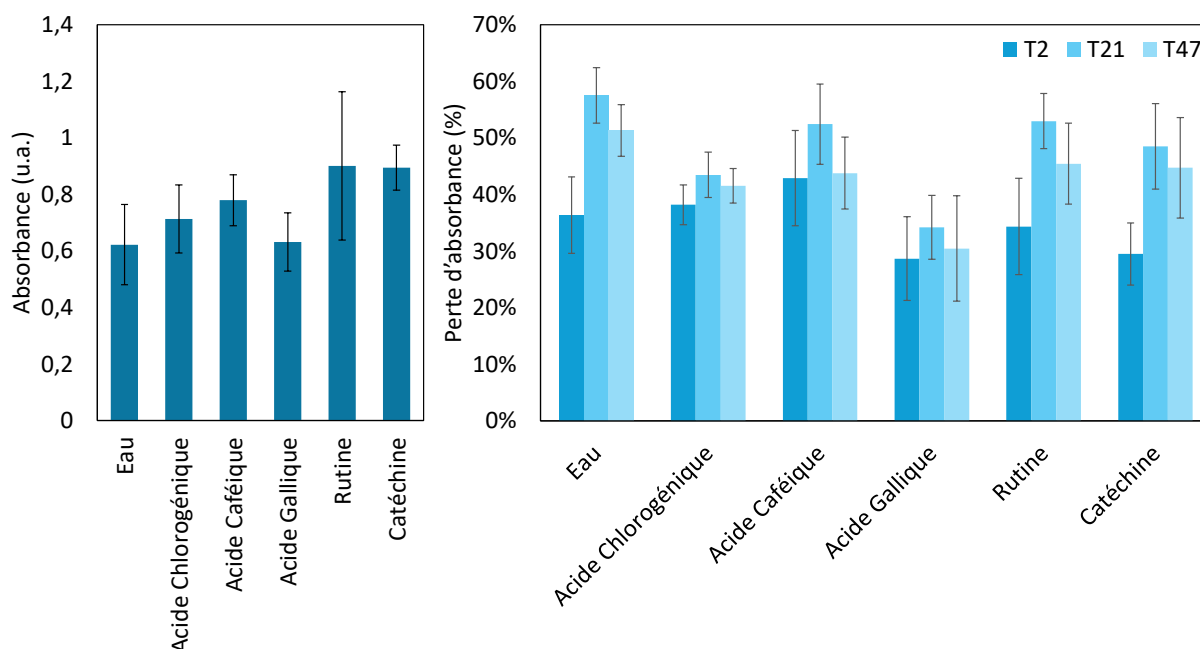


**Figure IV-15 :** Absorbance à 440 nm à T0 (à gauche) et perte d'absorbance après 2 h (T2), 21 h (T21) et 47 h (T47) (à droite) des extraits obtenus dans l'eau et les solutions de standards à 4 mg/mL. Toutes les extractions ont été réalisées en triplicats et les extraits ont été déposés en triplicats ( $n = 3 \times 3$ ).

Après 2h à l'abri de la lumière, tous les extraits perdent 30 à 40% de leur absorbance. L'ajout des composés phénoliques ne semble donc pas empêcher la dégradation rapide de l'hématéine. En revanche, l'absorbance à 440 nm de l'extrait réalisé avec de l'acide gallique n'évolue plus après ces deux premières heures. Ainsi, 47 h après l'extraction, la perte d'absorbance de l'extrait avec acide gallique est toujours à 30%, tandis que les autres extraits ont perdu 40 à 50% de leur absorbance. Une analyse de variance a permis de montrer que cette différence est significative ( $p \leq 0,05$ ).

L'acide gallique est donc la première solution potentielle au problème de stabilité de l'extrait de campêche. Cependant, nous ne pouvons pas déterminer à partir des données obtenues si ce résultat est dû à un phénomène de co-pigmentation et/ou à l'activité antioxydante de l'acide gallique. Ce dernier étant présent dans de nombreuses plantes et notamment à des concentrations particulièrement élevées dans certains fruits comme la mangue, la goyave, la grenade ou les fruits rouges, la co-extraction est une solution envisageable et compatible avec le développement d'ingrédients cosmétiques [443,444].

### C. Encapsulation

La troisième méthode de stabilisation envisagée est l'utilisation de cyclodextrines pour encapsuler l'hématéine et ainsi la protéger de l'oxydation. Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques produits à partir de la modification enzymatique d'amidon de faible toxicité qui sont déjà utilisés dans certains produits alimentaires et pharmaceutiques et qui sont autorisés en cosmétique [60,445,446]. Les plus utilisées sont l' $\alpha$ -CD, la  $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD contenant respectivement 6, 7 et 8 unités de D(+)-glucopyranose reliés par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -1,4 (Figure IV-16) [445,446].

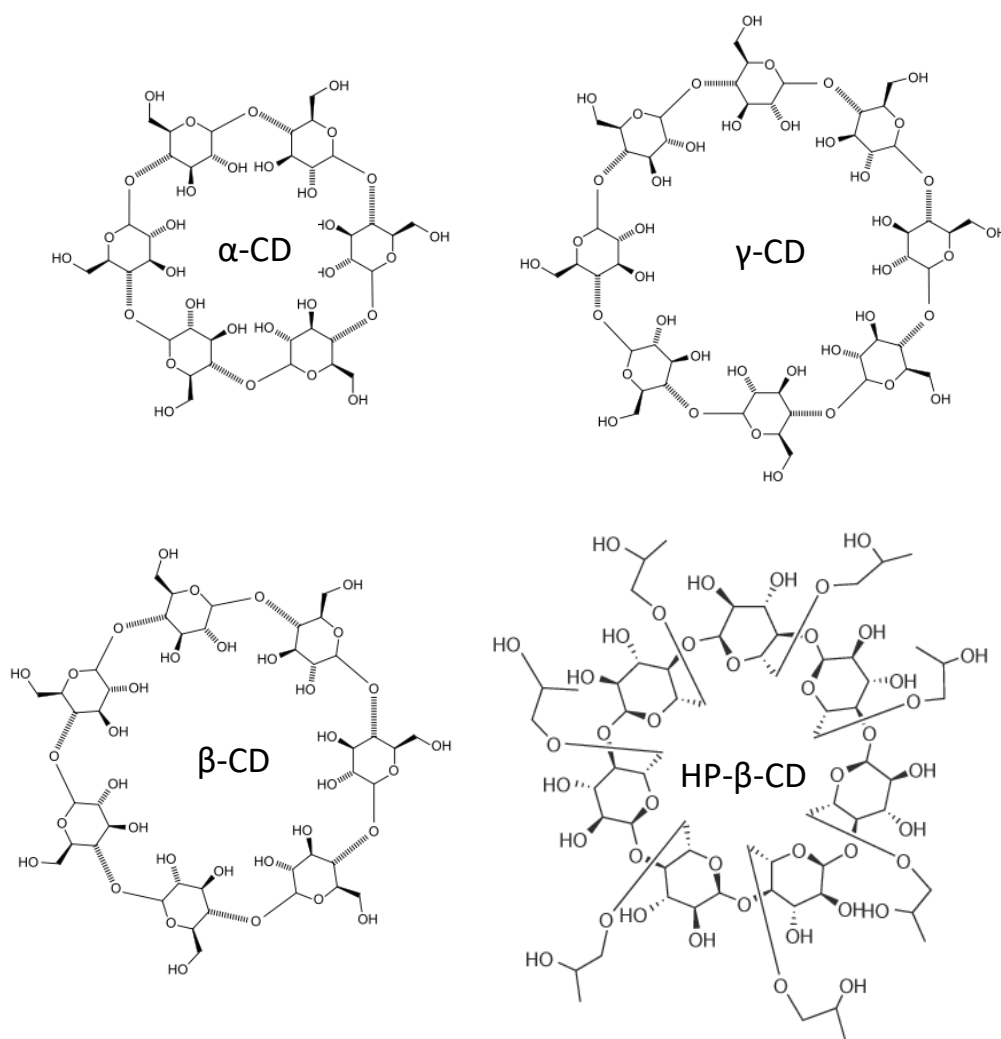


**Figure IV-16 :** Structures des cyclodextrines utilisées pour l'encapsulation de l'extrait de campêche.

L'arrangement des unités forme une cavité plutôt hydrophobe, tandis que la partie externe de la molécule est hydrophile. Cette structure leur permet de former des complexes d'inclusion avec de nombreuses molécules par la formation de liaisons non-covalentes à l'intérieur de la cavité. La formation de ce complexe dépend à la fois de la taille et de la forme

de la molécule à encapsuler, de la taille de la cavité de la cyclodextrine (liée au nombre d'unités osidiques) et de facteurs thermodynamiques déterminant l'affinité entre la cyclodextrine et la molécule à encapsuler [445]. Pour les composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, c'est généralement la  $\beta$ -cyclodextrine et ses dérivés qui sont utilisés [268,445], tout comme pour les bétalaïnes [66,267]. Yang *et al.* ont utilisé l'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine (HP- $\beta$ -CD) pour encapsuler et stabiliser la braziline [446].

### 1. $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ cyclodextrines

Dans un premier temps, des solutions aqueuses d' $\alpha$ -CD à 100 mg/mL, de  $\beta$ -CD à 15 mg/mL et de  $\gamma$ -CD à 200 mg/mL ont été préparées. Ces concentrations ont été choisies en fonction de la limite de solubilité de chaque cyclodextrine, correspondant respectivement à 130 g/L, 18 g/L et 249 g/L, afin de maximiser la quantité de cyclodextrine en solution [447]. En effet, l'encapsulation n'étant pas ciblée et parce que l'affinité relative des différents composants de l'extrait n'est pas connue, une plus haute concentration en cyclodextrine augmente les chances que l'hématéine soit encapsulée [445]. Ces solutions ont été utilisées pour extraire la poudre de campêche dans les conditions décrites précédemment (30 min, 40°C, 50 mg/mL) et l'absorbance de l'extrait obtenu après centrifugation a été mesurée à T0 et après 4h30 (T4,5) et 21h (T21) (Figure IV-17).

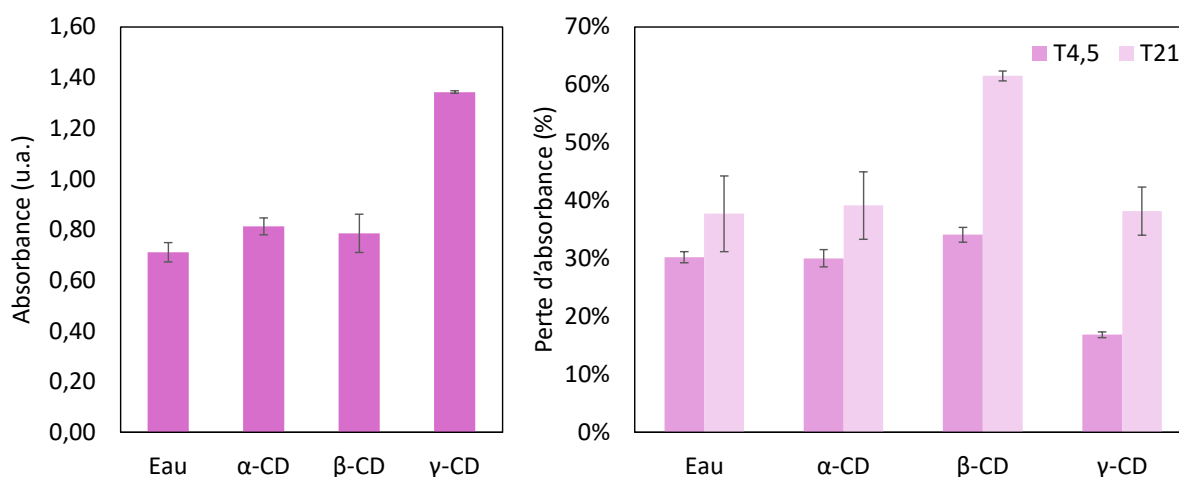


**Figure IV-17** : Absorbance à 440 nm à T0 (à gauche) et perte d'absorbance après 4h30 (T4,5) et 21 h (T21) (à droite) des extraits obtenus dans l'eau et les solutions de cyclodextrines. Toutes les extractions ont été réalisées en triplicats et les extraits ont été déposés en triplicats ( $n = 3 \times 3$ ).

A T0, l'absorbance à 440 nm des extraits réalisés dans l'eau, l' $\alpha$ -CD et la  $\beta$ -CD sont comparables. En revanche, l'absorbance de l'extrait réalisé dans la solution de  $\gamma$ -CD est

## CHAPITRE IV

largement supérieure, avec une faible variabilité (pour trois mesures d'absorbance sur trois réplicats d'extraction) (Figure IV-17). La  $\gamma$ -CD semble donc améliorer l'efficacité de l'extraction du colorant. La stabilité à court terme, après 4h30 à l'abri de la lumière semble aussi meilleure dans la solution de  $\gamma$ -CD, puisqu'on y observe une perte de  $17 \pm 1\%$  d'absorbance à 440 nm, tandis que pour les autres extraits, la perte oscille entre 30 et 34% (Figure IV-17). Cependant, après 21h de conservation à l'abri de la lumière, la perte d'absorbance est similaire dans tous les extraits, autour de 40% (Figure IV-17). L'absorbance à 440 nm de l'extrait réalisé dans la solution de  $\gamma$ -CD reste supérieure à celle des autres extraits, puisque son absorbance de départ est près de 2 fois supérieure, mais la  $\gamma$ -CD ne semble pas protéger l'hématéine de la dégradation au-delà de quelques heures.

La  $\beta$ -CD, généralement utilisée pour l'encapsulation des flavonoïdes n'est pas efficace pour stabiliser l'extrait de campêche et semble même augmenter sa dégradation. En effet, après 21h à l'abri de la lumière, l'extrait réalisé dans la solution de  $\beta$ -CD montre une perte d'absorbance à 440 nm de  $62 \pm 1\%$ , largement supérieure à celle observée dans l'eau. Cette dégradation pourrait être due à l'encapsulation préférentielle d'autres composés de l'extrait capables de stabiliser l'hématéine, potentiellement des composés antioxydants par exemples. En effet, la  $\beta$ -CD étant peu soluble dans l'eau par rapport aux deux autres cyclodextrines testées, sa concentration dans l'extrait est relativement faible (15 mg/mL) et certaines molécules bien que présentant de l'affinité pour la  $\beta$ -CD n'ont certainement pas pu être encapsulées.

### 2. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine

Un second essai a été réalisé avec l'HP- $\beta$ -CD à 50 mg/mL, dans les mêmes conditions d'extraction que précédemment (30 min, 40°C, 50 mg/mL). La limite de solubilité de l'HP- $\beta$ -CD est proche de 500 mg/mL, mais pour cet essai, nous avons limité sa concentration à 50 mg/mL, ce qui correspond à la quantité de plante extraite et qui permet à la cyclodextrine d'être en excès par rapport aux molécules de l'extrait, sans risque de saturer le solvant. Après l'extraction, les extraits ont immédiatement été centrifugés puis stockés à l'abri de la lumière et leur absorbance à 440 nm a été mesurée à T3 et T24 (Figure IV-18).

## CHAPITRE IV

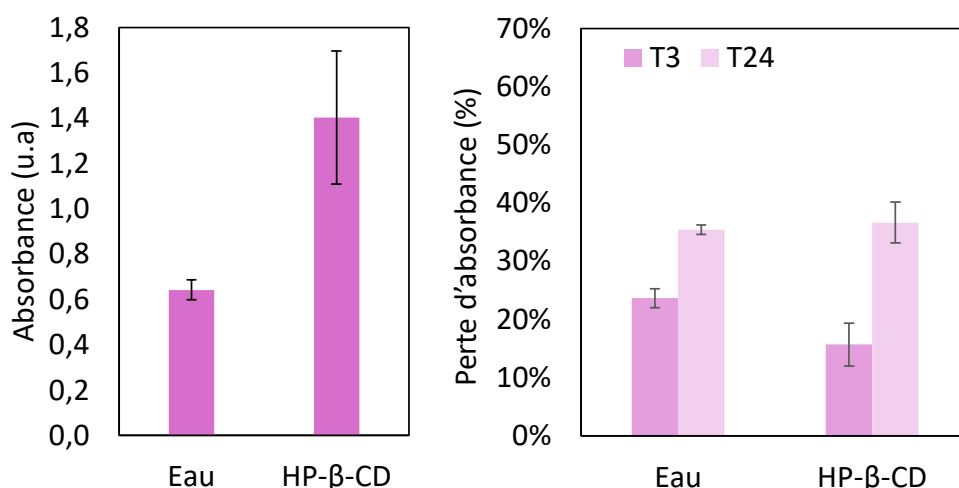


**Figure IV-18 :** Absorbance à 440 nm à T0 (à gauche) et perte d'absorbance après 3h (T3) et 24 h (T24) (à droite) des extraits obtenus dans l'eau et la solution d'HP-β-CD. Toutes les extractions ont été réalisées en triplicats et les extraits ont été déposés en triplicats (n = 3 x 3).

L'absorbance à 440 nm à T0 des extraits obtenus dans la solution d'HP-β-CD ( $1,40 \pm 0,29$  u.a.) est près de deux fois supérieure à celle des extraits eau ( $0,64 \pm 0,04$  u.a.) malgré la forte variabilité d'extraction dans l'HP-β-CD (Figure IV-18). La stabilité à court terme de l'extrait réalisé dans l'HP-β-CD est légèrement meilleure que celle de l'extrait eau, sa perte d'absorbance à 440 nm étant de  $16 \pm 4\%$  à T3, pour  $24 \pm 2\%$  pour l'extrait eau (Figure IV-18). En revanche, après 24h la perte d'absorbance des deux extraits est comparable, autour de 35% (Figure IV-18). Comme décrit précédemment pour la γ-CD, l'absorbance à 440 nm finale de l'extrait HP-β-CD reste supérieure à celle de l'extrait eau, mais sa stabilité n'est pas améliorée.

Les extraits eau et HP-β-CD ont été analysés par HPLC-DAD (méthode en Annexe 6) afin de comparer leur profil chromatographique. Pour cela, les extraits bruts ont été injectés à T0 et les chromatogrammes à 280 nm et 440 nm ont été comparés (Figure IV-19). L'HP-β-CD ne possède pas de chromophore et n'est donc pas visible sur ces chromatogrammes UV présentés en revanche elle est bien détectée sur le chromatogramme DEDL. Le profil des deux extraits est comparable, que ce soit à 280 nm ou à 440 nm, ce qui indique que les composés extraits sont les mêmes dans les deux solvants (Figure IV-19). En revanche, l'intensité des pics, notamment celle de l'hématéine à 440 nm, est plus élevée dans l'extrait HP-β-CD, ce qui explique la différence d'absorbance à 440 nm observée entre les deux extraits (Figure IV-19).

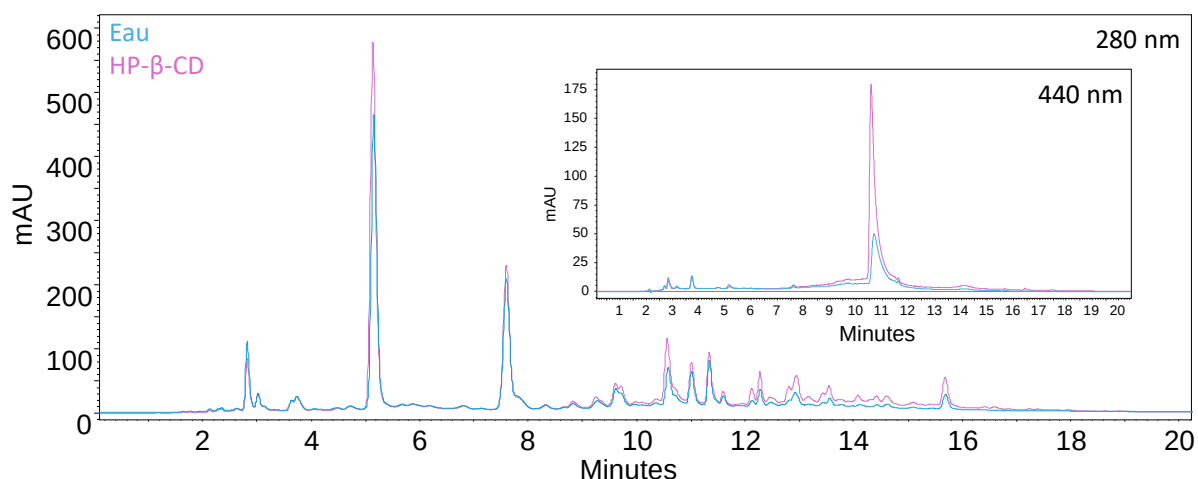


**Figure IV-19** : Chromatogrammes à 280 nm et 440 nm des extraits réalisés dans l'eau (bleu) et l'HP-β-CD (violet).

L'usage des cyclodextrines a donc permis d'améliorer l'extraction du colorant du campêche. L'augmentation de l'efficacité d'extraction des polyphénols par les cyclodextrines a déjà été décrite dans la littérature et est une piste d'intérêt pour l'optimisation de méthodes d'extraction à l'eau de molécules [268]. Cependant, si certaines cyclodextrines ont permis de favoriser la stabilité de l'extrait durant les premières heures suivant l'extraction, elles n'ont pas permis d'éviter sa dégradation à plus long terme. Pour aller plus loin, il serait intéressant de confirmer l'encapsulation de l'hématéine dans les cyclodextrines. Plusieurs méthodes ont été décrites pour cela, incluant des analyses spectroscopiques (UV, RMN...), électro-analytiques (conductimétrie, potentiométrie...) ou séparatives (HPLC, électrophorèse capillaire) [448]. Les conditions d'encapsulation (température, pH, concentration de cyclodextrine) pourraient aussi être optimisées.

#### D. NaDES

La dernière solution envisagée pour obtenir un extrait de campêche stable est l'utilisation de solvants eutectiques profonds naturels (NaDES). Les solvants eutectiques profonds sont formés à partir de deux composés dont le mélange à un ratio molaire particulier présente une température de fusion très inférieure à celle des deux composés purs [428,429]. Les NaDES sont considérés comme des solvants verts car ils sont constitués à partir de composés naturels, biodégradables et non toxiques [12,429]. De plus, ils sont déjà valorisés en cosmétique et peuvent être directement intégrés dans les formulations [12,428]. Lorsqu'ils sont utilisés pour l'extraction végétale, les NaDES peuvent permettre d'augmenter l'efficacité de l'extraction, en solubilisant de nombreux composés, mais ils ont aussi la capacité

## CHAPITRE IV

d'améliorer la stabilité des extraits [428,429]. Les NaDES ne sont pas des solvants à base d'eau, mais ils peuvent être dilués dans l'eau avant utilisation afin d'abaisser leur viscosité, ce qui peut, dans certains cas, augmenter l'efficacité de l'extraction [12,429].

Deux NaDES précédemment utilisés dans le laboratoire pour l'extraction de composés de polarité proche de celle de l'hématéine ont été utilisés pour l'extraction du campêche. Le premier est le LGH (acide lactique/glucose, 1/5) et le second est le PMH (L-proline/acide malique, 1/1). Lors de précédents travaux d'extraction sur d'autres matrices végétales, l'ajout d'eau dans ces deux NaDES a donné des résultats positifs dans une gamme de 10 à 40% d'eau. L'extraction du campêche a donc été réalisée dans cette gamme, dans les conditions d'extraction décrites précédemment (UAE, 30 min, 40°C, 50 mg/mL). L'absorbance à 440 nm des extraits dilués par 10 dans l'eau a été mesurée immédiatement après centrifugation des extraits (T0) et après 1h (T1) et 18h (T18) de stockage à l'abri de la lumière (Figure IV-20).

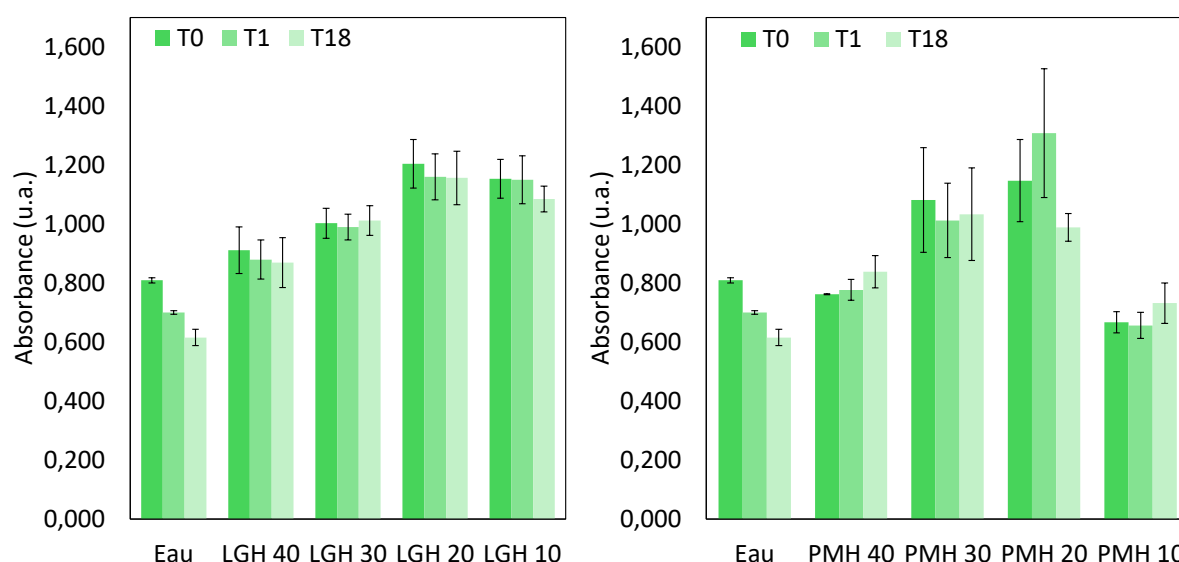


**Figure IV-20 :** Absorbance à 440 nm des extraits réalisés dans l'eau et dans les solutions de LGH et de PMH contenant 10 à 40% d'eau mesurée à T0 et après 1 h (T1) et 18 h (T18). Toutes les extractions ont été réalisées en triplicats et les extraits ont été déposés en triplicats (n = 3 x 3).

Quelle que soit la proportion d'eau ajoutée, les extraits obtenus avec les solutions de LGH ont tous une absorbance à 440 nm à T0 supérieure à celle de l'extrait eau. L'absorbance est d'autant plus élevée lorsque le solvant contient seulement 10 ou 20% d'eau. L'absorbance à 440 nm des extraits réalisés dans les solutions de LGH n'a pas diminué après 1h ou après 18h de stockage à l'abri de la lumière, tandis que celle de l'extrait eau a baissé d'environ 20%. Les

## CHAPITRE IV

extraits LGH sont donc stables pendant toute la durée de l'expérimentation quelle que soit la proportion d'eau ajoutée au solvant.

Les solutions de PMH étaient plus visqueuses que les solutions de LGH, ce qui a pu impacter l'efficacité et la variabilité d'extraction surtout sur les faibles volumes utilisés. Les extraits réalisés avec les solutions de PMH contenant 10 et 40% d'eau ont une absorbance à 440 nm similaire à celle de l'extrait eau (Figure IV-20). En revanche, celle-ci ne diminue pas durant le stockage, ce qui montre que la stabilité est améliorée. Les extraits réalisés avec les solutions de PMH avec 20 et 30% d'eau ont une absorbance à 440 nm supérieure à celle de l'extrait eau et comparable, compte tenu de la variabilité, à celle des extraits LGH avec 10 et 20% d'eau (Figure IV-20). Ces extraits semblent aussi plus stables que l'extrait eau, bien qu'il soit difficile de conclure pour l'extrait PMH avec 20% d'eau en raison de la variabilité (Figure IV-20).

### E. Conclusions sur la stabilisation du colorant

Plusieurs solutions ont été mises en place afin de tenter de stabiliser l'extrait de campêche pour être en mesure de le valoriser dans une formulation cosmétique. Si certaines d'entre elles n'ont pas été concluantes, comme l'acidification du solvant ou l'encapsulation dans les cyclodextrines, d'autres semblent être des pistes prometteuses.

Ainsi, l'ajout d'acide gallique lors de l'extraction permet une stabilisation de l'extrait pendant au moins 47 h. L'acide gallique étant un métabolite secondaire présent dans de nombreuses plantes, notamment des fruits autorisés en cosmétique, la co-extraction du campêche avec une source riche en acide gallique pourrait être efficace.

L'extraction par le LGH et le PMH, deux NaDES polaires, avec ajout de 10 à 30% d'eau, s'est aussi montrée efficace. Cette solution permet non seulement de stabiliser l'extrait, mais aussi d'augmenter l'efficacité de l'extraction du colorant. Il ne s'agit pas à proprement parler d'une extraction à l'eau, mais cette méthode pourrait être utilisée soit comme une méthode d'extraction comme présenté ici, soit comme une méthode de traitement post-extraction en diluant par exemple l'extrait aqueux dans le NaDES pur afin de le stabiliser. Elle permettrait alors de faire un lien entre l'extraction et la formulation cosmétique.

## VII. Conclusion

L'extraction assistée par ultrasons du campêche a été réalisée dans trois solvants de polarité différente (eau, éthanol et acétate d'éthyle), afin d'observer toute la gamme de composés

## CHAPITRE IV

présents dans la plante. L'extraction à l'eau a permis d'obtenir un rendement médian et une couleur plus intense par rapport aux deux autres solvants. Une analyse par HPLC-DAD-DEDL a montré que l'eau permettait d'extraire les mêmes composés que les deux autres solvants, dans des ratios différents.

Cette analyse a aussi permis d'observer que l'extrait aqueux contenait une faible proportion de métabolites primaires polaires (sucres et acides aminés), ce qui a pu être confirmé par HR-CCM. L'hypothèse de la richesse de l'extrait en composés phénoliques, connus notamment pour leur potentiel antioxydant valorisable en cosmétique, a été confirmée par le dosage de Folin-Ciocalteu. En effet, une teneur d'environ 7,5% de composés phénoliques dans l'extrait sec a été mesurée. Le dosage de l'hématéine, le composé responsable de la couleur de l'extrait a aussi été réalisé et une concentration d'environ 7,5% dans l'extrait sec a été mesurée.

Une analyse UHPLC-HRMS/MS a été réalisée afin d'identifier les composés majoritaires de l'extrait. Celle-ci a permis de déterminer que le principal composé de l'extrait est l'hématoxyline, le précurseur incolore de l'hématéine. L'hématéine, ainsi que l'hématoxylole B ont aussi pu être identifiés. Les autres molécules de l'extrait restent à ce jour non identifiées, mais d'après les premiers résultats, il semble que la plupart soient des homoisoflavonoïdes.

Enfin, la stabilité de l'extrait a été étudiée afin de déterminer dans quelles conditions celui-ci pourrait être valorisé en formulation cosmétique. La dégradation rapide de la couleur de l'extrait indépendamment du solvant ou de la méthode d'extraction employés nous a menés à envisager différentes techniques de stabilisation. L'acidification de l'eau, l'ajout de composés phénoliques antioxydants et pouvant agir comme co-pigments, l'encapsulation dans les cyclodextrines et l'usage de NaDES ont ainsi été utilisés afin de stabiliser l'extrait. L'ajout d'acide gallique de NaDES s'est révélé efficace pour améliorer la stabilité de l'extrait et même l'efficacité de l'extraction dans le cas des NaDES. Ces méthodes sont des pistes qui pourront être explorées plus avant afin d'obtenir un extrait optimisé pouvant être valorisé directement en formulation. L'activité antioxydante de l'extrait et sa formulation seront détaillées dans le chapitre suivant, dédié à la valorisation cosmétique des extraits présentés précédemment.

## Chapitre V

### Valorisation cosmétique d'extraits aqueux de plantes tinctoriales

### I. Introduction

Dans les chapitres précédents, une méthode d'extraction à l'eau a été optimisée pour chacune des plantes tinctoriales étudiée et les extraits obtenus ont été étudiés en termes de couleur, de composition et, pour le campêche, de stabilité. Nous avons ainsi pu montrer que l'extraction à l'eau peut être utilisée pour extraire des composés aux caractéristiques variées. Cette thèse étant réalisée avec l'entreprise cosmétique Terre de Couleur, le devenir final de ces extraits est une valorisation dans des produits cosmétiques comme ingrédients multifonctionnels alliant couleur et activité.

Dans cet objectif, l'activité biologique des extraits de la racine de garance des teinturiers, de la graine de roucou et du duramen de campêche a été étudiée. Les expérimentations ont été concentrées sur deux activités pouvant être mesurées directement au laboratoire et être utilisées dans différents types de produits cosmétiques, notamment des produits capillaires, la spécialité de Terre de Couleur. La première est l'activité antioxydante, qui peut être valorisée comme favorisant la stabilité du produit, mais aussi pour son intérêt dans la protection de la peau, du cuir chevelu et des cheveux contre le vieillissement prématuré [64,449]. La seconde est l'activité anti-UV, liée à la filtration des rayonnements ultraviolets afin qu'ils n'atteignent pas la peau ou les cheveux. En effet, les rayons UV constituent la première cause de vieillissement de la peau et peuvent causer une dégradation de la résistance des cheveux ainsi qu'une modification de leur couleur [58,450]. Les filtres UV ne sont d'ailleurs plus limités aux écrans solaires, puisqu'on les retrouve aujourd'hui dans de nombreux produits du quotidien pour assurer en permanence cette protection face aux UV [450].

Dans un deuxième temps, différentes techniques de formulation des extraits ont été envisagées. Ainsi, la formulation de l'extrait sec, mais aussi de l'extrait brut, conditions classiques d'utilisation des extraits végétaux, ont d'abord été expérimentés. L'extraction dans une solution de tensioactif a aussi été envisagée pour la garance et le roucou, qui contiennent des colorants peu hydrosolubles. Cette méthode devrait permettre d'obtenir rapidement et sans appareillage spécifique des extraits concentrés et prêts à formuler.

Dans l'objectif d'allier extraction et formulation, les poudres de plantes ont été directement formulées dans un shampoing de l'entreprise Terre de Couleur. Le procédé d'extraction du

roucou, dont le solvant est composé d'une phase eau et d'une phase huile qui constituent les bases d'une émulsion, a été adapté afin d'être réalisé directement lors de la formulation. Ce procédé d'extraction-formulation a été réalisé par une méthode classique, puis assistée par ultrasons en utilisant les paramètres définis dans le chapitre consacré à l'extraction du roucou.

Ces différentes voies de formulation ont pour objectif de limiter le nombre d'étape du procédé global et s'inscrivent ainsi dans une démarche éco-responsable, visant à diminuer la consommation d'eau et d'énergie, à diminuer la quantité d'ingrédient en les remplaçant par les actifs présents dans les extraits végétaux et à limiter la production de déchets. Elles ont été confiées à l'entreprise comme des pistes potentielles de développement permettant de valoriser l'intégralité des extraits aqueux développés, mais aussi pouvant être adaptées à d'autres plantes tinctoriales.

## II. Activité biologique des extraits optimisés

Les extraits de plantes obtenus lors de la thèse sont des mélanges complexes de molécules, certaines ayant des propriétés tinctoriales et d'autres étant réputées pour leurs activités potentiellement valorisables en cosmétique. Ils peuvent donc être valorisés en tant que colorants dans les formulations cosmétiques, mais aussi en tant qu'ingrédients actifs.

### A. Activité antioxydante

La première activité étudiée lors de la thèse est l'activité antioxydante. Dans une formulation, un extrait riche en antioxydants peut contribuer à protéger la peau du vieillissement lié à l'âge et aux agressions extérieures comme la pollution ou les rayonnements ultraviolets [64]. Les antioxydants peuvent aussi agir sur le vieillissement prématuré et la protection contre le stress oxydatif au niveau du cuir chevelu et des cheveux, résultant en une protection de la couleur contre les dommages causés par les rayonnements UV, ainsi qu'une limitation de l'apparition de cheveux blancs et de la perte de cheveux [449]. Il peut aussi contribuer à la stabilité du produit cosmétique en prévenant l'oxydation des autres ingrédients, ce qui évite notamment le rancissement des lipides lorsque le produit contient une phase grasse [64].

L'activité antioxydante peut notamment être mesurée par différents tests colorimétriques catégorisés en fonction de leur mécanisme. Il existe des tests basés sur un transfert d'électron, ou sur un transfert d'hydrogène. Ces deux types de tests correspondent à une mesure de la capacité anti-radicalaire de l'échantillon. Enfin, d'autres tests sont basés sur la chélation de

## CHAPITRE V

métaux de transitions comme le fer, le zinc ou le cuivre, mais ils n'ont pas été réalisés dans cette thèse [451]. Il est généralement admis qu'aucun test d'activité n'est capable d'apprécier la capacité antioxydante totale d'un extrait. Il est donc recommandé d'utiliser plusieurs tests complémentaires. De plus, il s'agit de tests préliminaires, qui peuvent être utilisés lors du développement d'un ingrédient, mais qui ne peuvent pas représenter la complexité des phénomènes lié au stress oxydatif tels qu'ils existent au niveau cutané [65,451].

### 1. Garance

L'activité antioxydante de la garance a été mesurée par trois tests d'activité complémentaires, le test DPPH qui mesure l'activité anti-radicalaire par transfert d'hydrogène ou d'électron et les tests FRAP et CUPRAC qui mesurent la capacité de réduction du fer et du cuivre respectivement, par un transfert d'électron (méthode en Annexe 11) [451].

Le test DPPH, cible la capacité de piégeage des radicaux libres [451]. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est introduit sous sa forme radicalaire  $\text{DPPH}^\bullet$  de couleur violette. Lorsqu'un antioxydant donneur d'hydrogène est ajouté, le radical est réduit en DPPH neutre, de couleur jaune [451]. L'activité antioxydante est mesurée à partir de la diminution de l'absorbance à 516 nm (Equation V-1 A).

$$\text{Inhibition DPPH (\%)} = \frac{Abs_{\text{DPPH}^\bullet} - Abs_{\text{ech}}}{Abs_{\text{DPPH}^\bullet}} \times 100 \quad (\text{V-1 A})$$

$$\text{Activité FRAP/CUPRAC (\%)} = 1 - \frac{Abs_{T_{\text{max}}} - Abs_{\text{ech}}}{Abs_{T_{\text{max}}}} \times 100 \quad (\text{V-1 B})$$

Avec Abs : absorbance à 516 nm (DPPH), 590 nm (FRAP) et 450 nm (CUPRAC) , ech : puits contenant le réactif et l'échantillon dont l'activité est mesurée,  $\text{DPPH}^\bullet$  : puits contenant le radical DPPH et de l'éthanol,  $T_{\text{max}}$  : puits contenant le réactif et le trolox à une concentration correspondant à 100% d'inhibition.

Le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Assay) mesure la capacité de réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) [451]. Pour cela, une solution incolore de  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  est préparée à partir de  $\text{FeCl}_3$  et de TPTZ (2,4,6-tri-2-pyridinyl-1,3,5-triazine) en milieu acide. La réduction de ce complexe produit le  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ , un produit bleu. L'activité antioxydante est calculée à partir de l'augmentation de l'absorbance à 590 nm (Equation V-1 B) [451].

Enfin, le test CUPRAC (CUPric Reducing Antioxidant Capacity) mesure la capacité de réduction du Cuivre II en Cuivre I. Pour cela un complexe de couleur bleu est formé entre la néocuproïne et le cuivre II ( $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}$ ) à pH neutre. La réduction de ce complexe par un composé

## CHAPITRE V

antioxydant produit le  $[\text{Cu}(\text{Nc})]^+$ , de couleur orange. L'activité antioxydante est mesurée à partir de l'augmentation de l'absorbance à 450 nm (Equation V-1 B). Pour tous les tests, le trolox, un analogue hydrophile de la vitamine généralement utilisé comme référence dans les tests d'activité antioxydante, a été utilisé comme référence.

L'extrait optimisé de garance a été analysé à 5 mg/mL pour les trois tests d'activité. Une faible inhibition du DPPH a été observée ( $5,5 \pm 0,4\%$ ) à cette concentration. L'extrait n'a cependant pas pu être analysé à une plus haute concentration car il absorbe à 516 nm, ce qui cause une interférence au-delà de 5 mg/mL. L'extrait de garance ne possède donc pas une capacité de piégeage des radicaux libres élevée.

L'activité de l'extrait optimisé de garance mesurée par le test FRAP est de  $28,0 \pm 1,1\%$  (Figure V-1). Celle-ci est de  $44,6 \pm 1,1\%$  à 0,3 mg/mL et  $15,8 \pm 0,5\%$  à 0,1 mg/mL pour les solutions de trolox (Figure V-1). L'extrait de garance possède donc une capacité modérée de réduction du fer ferrique en fer ferreux. Pour le test CUPRAC, l'activité mesurée de l'extrait de garance est de  $45,5 \pm 2,2\%$ , un résultat comparable à celui du trolox à 0,5 mg/mL ( $50,2 \pm 2,0\%$ ) (Figure V-1). La capacité de l'extrait à réduire le cuivre II en cuivre I est donc encore une fois modérée.

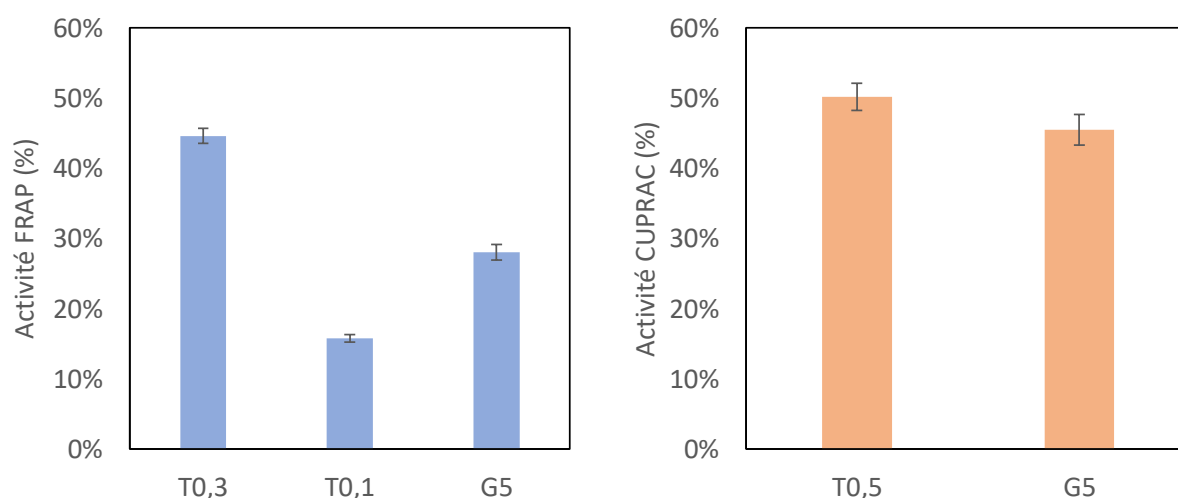


**Figure V-1 :** Activité antioxydante mesurée par le test FRAP (bleu) et CUPRAC (orange). L'activité de l'extrait de garance à 5 mg/mL (G5) est comparée à l'activité du trolox, utilisé comme référence à 0,5 mg/mL (T0,5), 0,3 mg/mL (T0,3) et 0,1 mg/mL (T0,1).

L'extrait de garance a donc montré une activité antioxydante peu intense malgré sa richesse en anthraquinones et en flavonoïdes. Essaidi *et al.* ont décrit une  $\text{CE}_{50}$  (concentration efficace médiane correspondant à 50% d'efficacité) de 59  $\mu\text{g/mL}$ , soit 0,06 mg/mL sur le test ABTS (dont le mécanisme est comparable à celui du DPPH) et 244,5  $\mu\text{g/mL}$  soit 0,25 mg/mL pour le

## CHAPITRE V

test FRAP [452] et Houari *et al.* ont obtenu une CE50 de 0,68 mg/mL [298]. Dans les deux travaux, l'extrait étudié a été obtenu par macération dans un solvant méthanol/eau (80/20) [298,452]. Notre extrait testé à une concentration supérieure (5 mg/mL) à ces CE50 n'atteignant pas les 50% d'activité sur aucun des tests réalisés, nos résultats montrent une activité antioxydante plus faible. La suite des travaux d'Essaidi *et al.* montre que l'hydrolyse de l'extrait, qui sépare les anthraquinones glycosylées des sucres pour libérer les anthraquinones aglycones, permet de diviser par 10 et par près de 4 la CE50 obtenue pour les tests ABTS et FRAP respectivement. Il est donc possible que la richesse en anthraquinones glycosylées de l'extrait aqueux obtenu par MAE qui est supérieure à celle d'un extrait hydro-alcoolique (chapitre II) influe sur son activité antioxydante globale [452].

### 2. Campêche

#### a. Test d'activité ABTS

L'activité antioxydante de l'extrait aqueux de campêche préparé à 0,50 et 0,25 mg/mL a été mesurée par le test ABTS (méthode en annexe 11). Celui-ci fonctionne sur le même principe que le test DPPH et mesure la capacité de piégeage des radicaux libres de l'extrait. Pour cela, l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS) est converti en radical  $ABTS^{\cdot+}$ , de couleur bleue, par une réaction avec le persulfate de potassium [451]. En présence de composés antioxydants donneurs d'hydrogène, le radical est réduit en  $ABTS^+$ , causant la décoloration de la solution [451]. L'activité antioxydante est calculée à partir de la diminution de l'absorbance à 734 nm (Equation V-2).

$$Inhibition\ ABTS\ (\%) = \frac{Abs_{ABTS^{\cdot+}} - Abs_{ech}}{Abs_{ABTS^{\cdot+}}} \times 100 \quad (V-2)$$

Avec Abs : absorbance à 734 nm,  $ABTS^{\cdot+}$  : puits contenant le radical et de l'eau, ech : puits contenant le radical et l'échantillon dont l'activité est mesurée

L'activité mesurée pour l'extrait de campêche à 0,5 mg/mL est de  $99,6 \pm 0,0\%$  et celle de l'extrait à 0,25 mg/mL est de  $61,9 \pm 2,2\%$  (Figure V-2). Pour comparaison, l'activité du trolox est de  $99,6 \pm 0,1\%$  à 1 mg/mL et  $64,6 \pm 3,4\%$  à 0,25 mg/mL (Figure V-2).

## CHAPITRE V

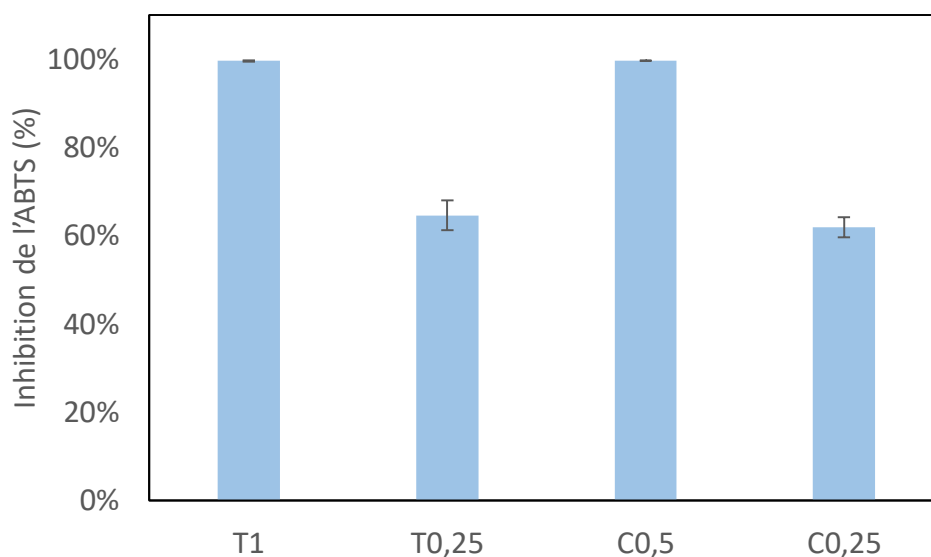


**Figure V-2 :** Activité antioxydante du trolox utilisé comme référence à 1 mg/mL (T1) et 0,25 mg/mL (T0,25) et de l'extrait de campêche préparé à 0,5 mg/mL (C0,5) et 0,25 mg/mL (C0,25).

D'après ces résultats, l'extrait aqueux de campêche possède une capacité de piégeage des radicaux libres comparable à celle du trolox. Kang *et al.* ont mesuré l'activité antioxydante d'un extrait aqueux de campêche à 0,1 mg/mL par les tests DPPH et ABTS et obtenu des résultats similaires à 34,7% et 36,5% [453]. Ce résultat est en adéquation avec les valeurs que nous avons mesurées, compte tenu des différences de protocole de test, d'échantillon de plante et méthode d'extraction.

### b. Bioautographie DPPH

Afin de déterminer quels composés sont responsables de la bonne activité antioxydante de l'extrait de campêche, un test DPPH a été réalisé par bioautographie. La bioautographie consiste à réaliser le test sur un extrait séparé par une méthode de chromatographie sur couche mince, directement sur la phase stationnaire [454]. Elle est utilisée avec des tests d'activité anti-bactérienne, anti-fongique, antioxydante ou des tests d'inhibition enzymatique et permet de déterminer les composés responsables de l'activité d'un extrait [454].

Les composés de l'extrait de campêche (5 mg/mL, dépôt de 5  $\mu$ L) ont été séparés par HR-CCM (méthode en Annexe 5). Une solution de DPPH à 0,2% a ensuite été pulvérisée sur la plaque afin de révéler en blanc sur fond violet les composés antioxydants (Figure V-3). Une solution standard d'hématoxyline, l'un des principaux composés du campêche a été éluée dans les mêmes conditions que l'extrait afin d'aider à l'identification des molécules détectées (Figure V-3).

## CHAPITRE V

Après élution, l'extrait de campêche comporte deux larges bandes correspondant chacune à un composé majoritaire. La première, élue à un  $R_f$  compris entre 0,63 et 0,73 a été identifiée comme l'hématéine d'après sa couleur violette (Figure V-3). La seconde bande est grise et possède un  $R_f$  de 0,9, ce qui correspond à la bande observée après l'élution du standard d'hématoxyline (Figure V-3). L'hématoxyline étant un composé incolore et instable, la bande détectée correspond probablement à un produit de dégradation plutôt qu'à l'hématoxyline elle-même.

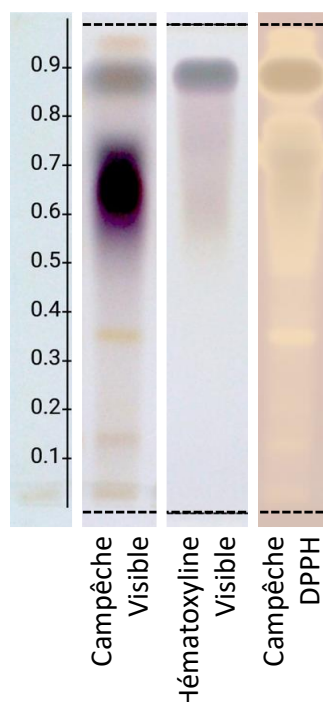


**Figure V-3 :** Plaque HR-CCM de l'extrait de campêche et de l'hématoxyline après élution et de l'extrait de campêche après révélation par le DPPH. Les visualisations ont été réalisées dans le visible. Phase stationnaire : plaques HPTLC gel de silice 60 F<sub>254</sub>. Phase éluante : acétate d'éthyle/eau/acide formique/acide acétique (100/27/11/11).

Après révélation par le DPPH, une large portion de l'extrait est révélée en blanc sur fond rose, ce qui est en adéquation avec la forte activité antioxydante mesurée précédemment. Les bandes correspondant à l'hématéine et à l'hématoxyline ont notamment été révélées, indiquant qu'elles participent à l'activité antioxydante de l'extrait. Un autre composé, élué à un  $R_f$  de 0,37 a aussi été révélé par le DPPH. Ce dernier est déjà visible avant révélation sous la forme d'une bande jaune pâle. Il n'a cependant pas pu être identifié. Plusieurs autres bandes correspondant à des composés antioxydants semblent co-élues avec l'hématéine, ce qui pourrait indiquer qu'il s'agit d'autres homoisoflavonoïdes.

La capacité de piégeage des radicaux libres de l'extrait de campêche est donc portée par plusieurs molécules, incluant les deux marqueurs de la plante, l'hématoxiline et l'hématéine.

### 3. Roucou

L'activité antioxydante des deux phases de l'extrait optimisé de roucou a précédemment été décrite dans le chapitre III, consacré au développement d'une méthode d'extraction des colorants du roucou. Pour les deux phases, un test ciblant la capacité de piégeage des radicaux libres a été réalisé. Pour des raisons de solubilité, le test DPPH a été utilisé pour la phase huile et le test ABTS pour la phase eau. La phase huile a montré une activité antioxydante de  $61,0 \pm 8,1\%$  après une dilution par deux, soit une activité comparable à celle du trolox à  $0,1 \text{ mg/mL}$  ( $63,9 \pm 5,6\%$ ). Cette activité a été attribuée en grande partie à l'huile végétale, dont l'activité a été mesurée à  $59,0 \pm 1,2\%$ . Elle est aussi probablement portée par la bixine et le  $\delta$ -tocotriénol, qui ont pu être identifiés dans la phase huile et dont les propriétés antioxydantes sont largement décrites [332,333,455]. L'activité antioxydante de la phase eau diluée par 2 a été mesurée à  $71,6 \pm 2,9\%$ , un résultat intermédiaire entre les solutions référence de trolox à  $1 \text{ mg/mL}$  ( $100,0 \pm 0,2\%$ ) et  $0,1 \text{ mg/mL}$  ( $35,4 \pm 0,8\%$ ). La phase eau est composée principalement d'acides phénoliques et d'ellagitannins, des composés dont l'activité antioxydante a précédemment été décrite [335,456]. De plus, Cardarelli *et al.* ont mesuré l'activité antioxydante d'extraits de roucou obtenus avec différents solvants (méthanol 50% ou pur, éthanol 50% ou pur, acétate d'éthyle et hexane) par un test ABTS et obtenu une corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits [335].

### B. Activité anti-UV

La capacité des extraits à absorber les rayonnements ultraviolets (UV) a aussi été mesurée afin de déterminer leur intérêt dans la protection anti-UV. En effet, les UV sont la première cause de vieillissement prématuré de la peau et peuvent impacter la couleur et la résistance des cheveux [58,450]. Ce type d'actifs n'est ainsi plus limité aux produits solaires et est présent dans de plus en plus de produits cosmétiques utilisés au quotidien [450]. Dans ce contexte, les filtres UV d'origine végétale sont de plus en plus étudiés car ils sont moins toxiques pour l'homme et l'environnement et biodégradables [58].

La comparaison de l'absorbance des extraits dans l'ultraviolet à des filtres UV chimiques d'origine synthétique de référence permet de tester de façon préliminaire le potentiel anti-UV des extraits végétaux avant de les soumettre à un test d'activité directement sur peau,

plus onéreux et ne pouvant pas être réalisé directement dans notre laboratoire. Pour cela, une mesure par spectrophotométrie de la capacité des extraits à filtrer les rayonnements UV-A (320-400 nm) et UV-B (290-320 nm) a été réalisée et comparée à celles de deux filtres UV de référence, l'avobenzone (filtre UV-A) et l'octinoxate (filtre UV-B) [457,458].

### 1. Molécules de référence

Les filtres UV chimiques sont des molécules capables d'absorber les rayonnements UV, ce qui peut être mesuré par spectrophotométrie. Des essais préliminaires non présentés ici ont été réalisés par une stagiaire de Master 1 co-encadrée lors de la thèse. Ceux-ci ont permis de mettre en place le test et notamment de choisir les concentrations des molécules de référence. Pour l'octinoxate, au-delà de 15  $\mu\text{g/mL}$ , l'absorbance arrive rapidement à saturation. Pour l'avobenzone, nous avons utilisé la même concentration afin de garder le même comparatif. De plus, la concentration maximale autorisée d'avobenzone en formulation est de 5%, tandis que celle de l'octinoxate est de 10% [60]. Utiliser une concentration de référence d'avobenzone supérieure à celle de l'octinoxate ne serait donc pas cohérent par rapport à l'usage réel de ces filtres UV.

Des solutions standard d'octinoxate et d'avobenzone ont donc été préparées à 15  $\mu\text{g/mL}$  et leur spectre d'absorbance a été mesuré en triplicats entre 250 et 450 nm (Figure V-4). L'octinoxate absorbant principalement dans les UV-B ( $\lambda_{\text{max}}$  311 nm) et l'avobenzone dans les UV-A ( $\lambda_{\text{max}}$  360 nm) (Figure V-4), leurs spectres respectifs ont été utilisés comme références dans ces gammes de longueur d'onde.

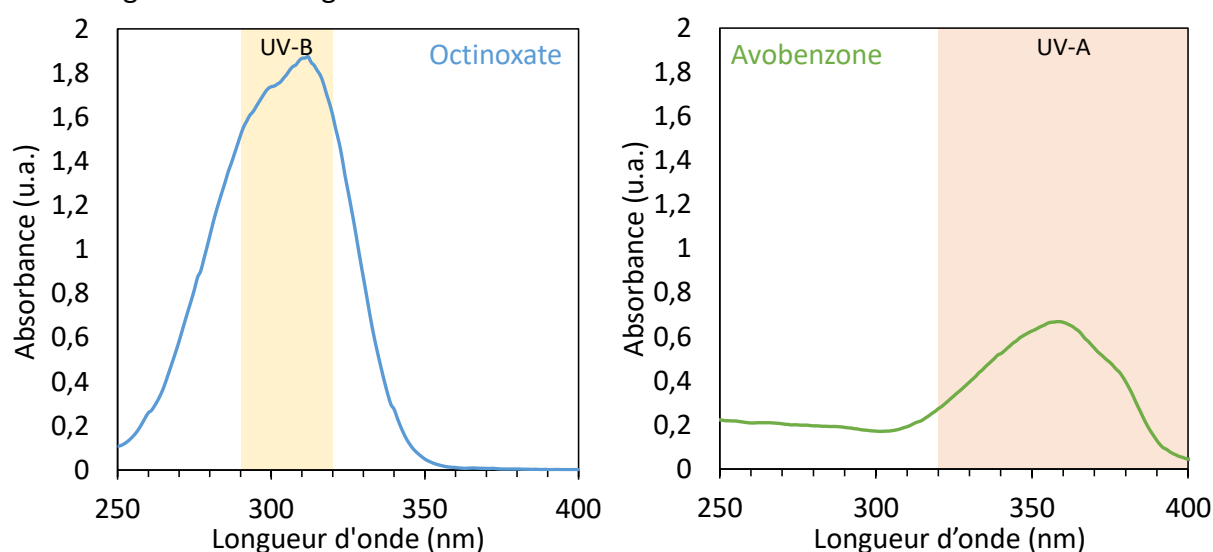


**Figure V-4 :** Spectre d'absorbance (250-450 nm) de l'octinoxate (bleu) et de l'avobenzone (vert). La zone des des UV-B (290-320 nm) est affichée en jaune et celle UV-A (320-400 nm) est affichée en orange.

## 2. Extraits

Pour mesurer la capacité des extraits à absorber les UV-A et UV-B, leurs spectres d'absorbance (250-600 nm) ont été comparés à ceux des filtres UV de référence (Figure V-5). Pour cela, de nouvelles extractions ont été réalisées à plus grande échelle, en utilisant l'extraction assistée par ultrasons (30 min, 40 kHz) et en adaptant les solvants afin d'obtenir des extraits comparables aux extraits optimisés et pouvant être séchés. Ainsi, l'extrait de garance a été réalisé avec 10 g de plante pour 360 mL de mélange éthanol/eau (50/50), l'extrait de roucou a été obtenu avec 10 g de plante pour 200 mL de mélange eau/acétate d'éthyle et l'extrait de campêche avec 10 g de plante pour 200 mL d'eau. Les extraits ont ensuite été séchés, puis repris en solution dans l'éthanol à une concentration permettant d'obtenir une absorbance comparable à celle des spectres de référence. L'extrait de garance des teinturiers a donc été analysé en triplicats à 0,5 mg/mL, l'extrait de roucou à 1 mg/mL et l'extrait de campêche à 0,1 mg/mL.

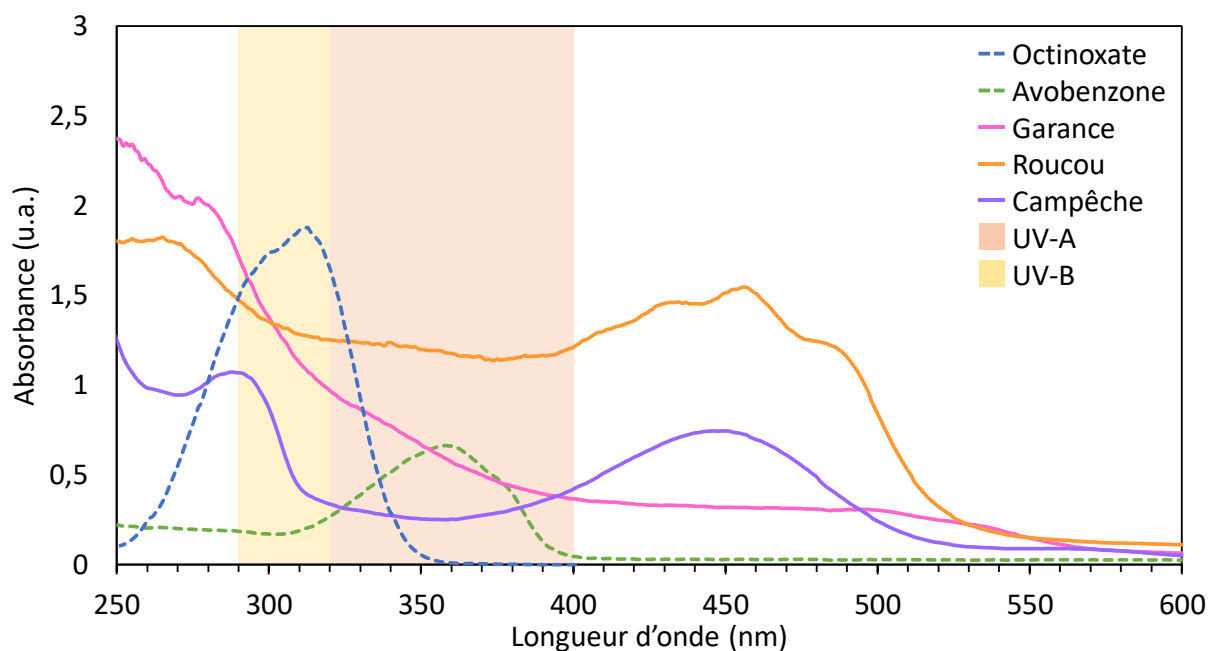


**Figure V-5** : Spectre d'absorbance (250-600 nm) des solutions d'octinoxate et d'avobenzone (15 µg/mL) et des extraits de garance (0,5 mg/mL) en rose, de roucou (1 mg/mL) en orange et de campêche (0,1 mg/mL) en violet.

Les spectres d'absorbances des trois extraits montrent une bande d'absorption dans le visible entre 400 et 600 nm, liées à leurs couleurs respectives, mais aussi une absorbance dans l'ultraviolet. L'extrait de garance absorbe à la fois dans les UV-A et les UV-B, avec une plus forte absorbance dans les UV-B. (Figure V-5). A 0,5 mg/mL, son absorbance est proche de celle de l'octinoxate dans les UV-B et supérieure à celle de l'avobenzone dans les UV-A (Figure V-5).

## CHAPITRE V

L'extrait de roucou à 1 mg/mL absorbe de façon constante sur toute la gamme UV d'intérêt (Figure V-5). Son absorbance est notamment supérieure à celle de l'avobenzène dans les UVA. Quant au campêche, son pic d'absorption dans les UV est situé à la marge entre les UV-B (290-320 nm) et les UV-C (100-290 nm) et son absorbance dans les UV-A est très faible.

D'après ces résultats, les extraits de garance et de roucou ont un certain potentiel anti-UV. Les concentrations testées des extraits végétaux sont supérieures à celles des standards, car les extraits sont des mélanges complexes de molécules, incluant certaines, comme les flavonoïdes et anthraquinones de la garance ou les ellagitannins du roucou, qui absorbent dans la gamme des UV-B, mais aussi d'autres qui ne possèdent pas de chromophore ou absorbent dans une autre gamme de longueurs d'ondes. Cependant, les concentrations testées sont cohérentes voire plutôt faibles par rapport aux concentrations retrouvées dans les produits cosmétiques. Par exemple, dans la suite de ce chapitre, la garance est utilisée à une concentration de 0,2% d'extrait sec, alors qu'elle est testée ici à 0,05%. Les extraits de garance et de roucou sont donc de bons candidats pour la réalisation de tests supplémentaires de leur capacité à filtrer les rayonnements UV.

A notre connaissance, l'activité anti-UV de l'extrait de garance des teinturiers n'a jamais été testée directement. Cependant, plusieurs travaux ont montré que la teinture par *Rubia tinctorum* permettait d'augmenter la capacité photoprotectrice des tissus teints [459–462]. Le colorant issu du roucou est réputé pour ses capacités photoprotectrices. Dans certains peuples d'Amérique du Sud, il est traditionnellement utilisé pour teindre la peau pour des raisons cosmétiques, mais aussi pour la protéger du soleil [342]. Ce potentiel, attribué à la richesse du colorant en apocaroténoïdes, est déjà valorisé dans certains produits cosmétiques en tant que filtre solaire [334,463].

### 3. Facteur de protection solaire

Le calcul du facteur de protection solaire (FPS) est la méthode de référence pour mesurer le potentiel anti-UV d'un produit. Il correspond au ratio entre la dose érythémale minimale (DEM) sur peau protégée et la DEM sur peau non protégée. La DEM étant la quantité minimale de lumière capable de déclencher un coup de soleil 24h après l'exposition. Un calcul permettant de calculer un FPS à partir de mesure spectrophotométriques a cependant été développé et est régulièrement utilisé pour l' (Equation V-3) [464–468].

## CHAPITRE V

$$FPS = \sum_{i=58}^{64} Abs_{5i} \times (EE \times I)_{5i} \quad (V-3)$$

Ce calcul correspond à la somme des absorbances obtenues entre 290 et 320 nm, avec un pas de 5 nm, pondérées par la valeur notée  $EE \times I$ , une constante donnée pour chaque longueur d'onde de la gamme (Annexe 11), qui correspond à la multiplication de l'efficacité érythémale et de l'intensité d'un simulateur solaire [466]. Ces valeurs ont été déterminées par Sayre *et al.* [466] et sont utilisées depuis dans le calcul du FPS à partir de données spectrophotométriques [467,468]. Ce calcul est donc spécifique aux UV-B et ne peut pas être utilisé pour mesurer la capacité à filtrer les UV-A.

Le FPS de l'octinoxate à 15 µg/mL et celui des extraits à 1 mg/mL (roucou), 0,5 mg/mL (garance) ou 0,1 mg/mL (campêche) ont été calculés. Pour l'octinoxate, un FPS de  $17,73 \pm 0,61$  a été obtenu. Pour l'extrait de garance des teinturiers et de roucou, le FPS calculé est proche de la valeur de référence, à  $12,73 \pm 0,74$  et  $13,35 \pm 0,09$  respectivement. Pour l'extrait de campêche le FPS a été calculé à  $6,68 \pm 0,04$ , une valeur plus faible, ce qui correspond aux observations réalisées à partir des spectres d'absorption.

La présence des extraits de garance ou de roucou dans une formulation aux concentrations testées ou à des concentrations supérieures pourrait permettre de diminuer les quantités nécessaires de filtre UV synthétique ou d'apporter à des produits ne contenant pas de filtre UV une légère capacité de photoprotection par leur capacité d'absorption des rayons UV, mais aussi par leur capacité antioxydante, notamment pour le roucou [73].

Par la suite, il serait intéressant de mesurer la diminution des valeurs d'absorbance après une exposition aux UV afin d'observer la stabilité des extraits. En effet, en cas de dégradation trop rapide, la capacité de photoprotection apportée par les extraits ne sera pas efficace en situation réelle. Or, comme mentionné précédemment, ce type d'actif peut aujourd'hui être valorisé dans des produits du quotidien, que ce soit pour la peau ou les cheveux. Ils pourraient par exemple être utilisés par l'entreprise Terre de Couleur pour apporter une protection du cheveu dans des soins sans rinçage ou des colorations capillaires. De plus, les résultats présentés sont préliminaires et il sera nécessaire de confirmer le potentiel de filtre solaire des extraits, directement sur les formulations cosmétique.

### III. Formulation d'extraits secs et liquides

Afin de développer de premiers prototypes de produits cosmétique finis intégrant les extraits développés dans les chapitres précédents et transférables à l'entreprise Terre de Couleur, différents essais de formulation ont été réalisés. La démarche adoptée dans cette partie a été de commencer par des protocoles de formulation conventionnelle en utilisant les extraits secs.

L'extrait optimisé de garance a donc été lyophilisé puis formulé dans un shampoing de l'entreprise Terre de Couleur en remplacement des pigments minéraux. Puis plusieurs méthodes alternatives, pouvant être mise en place par l'entreprise, ont été expérimentées afin d'intensifier la couleur des formules et de trouver des méthodes plus éco-responsables permettant d'utiliser au maximum la plante et l'extrait produit et de limiter le nombre d'étapes en associant extraction et formulation. En premier lieu, la formulation directe de l'extrait liquide a été utilisée pour le roucou. Chaque phase de l'extrait biphasique optimisé a ainsi été utilisée dans la formulation d'une crème capillaire. Dans un second temps, nous avons évalué la possibilité d'extraire les colorants, sans aucun appareillage spécifique, dans une solution aqueuse contenant un tensioactif prête à être formulée. Pour cela, nous avons étudié l'efficacité de l'extraction sous agitation dans une solution aqueuse contenant un tensioactif non-ionique naturel déjà utilisé par l'entreprise Terre de Couleur. Cette méthode d'extraction a été utilisée sur la garance des teinturiers et le roucou afin d'obtenir des ingrédients colorés pré-formulés pouvant être directement intégrés en formulation.

#### A. Formulation de l'extrait sec de garance dans un shampoing

Chaque gamme de produits développée par Terre de Couleur est représentée par une couleur, actuellement obtenue par des pigments naturels minéraux. L'extrait optimisé de garance lyophilisé a été formulé dans un shampoing Terre de Couleur (composition globale en Annexe 13) en remplacement du pigment minéral, à la même concentration, afin d'observer sa capacité à colorer un produit cosmétique.

Le shampoing formulé avec l'extrait de garance est celui de la gamme « rythme orange », pour lequel le pigment utilisé est un mélange d'oxyde de fer (jaune) et de trioxyde de fer (rouge) à une concentration totale de 0,2% (m/m). La formule classique avec pigments minéraux et la formule avec garance ont donc été préparées en parallèle avec une concentration de 0,2%.

## CHAPITRE V

L'extrait de garance a pu être solubilisé rapidement dans le shampoing de manière homogène. La couleur obtenue n'est pas orange, mais correspond à un rose pastel assez vif, qui pourrait être utilisé dans une gamme de produits différente (Figure V-6).

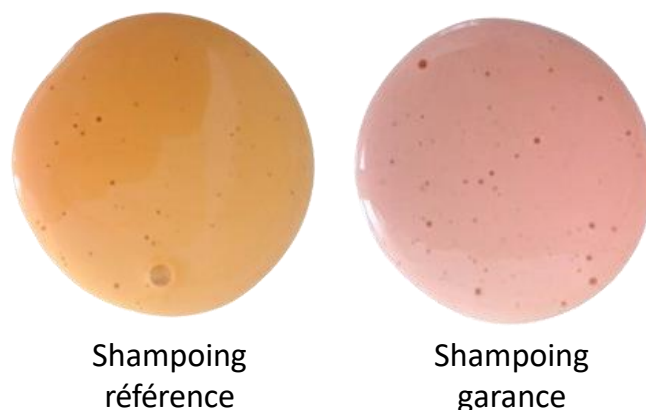


**Figure V-6 :** Photographie du shampoing référence contenant 0,2% de pigment minéral et du shampoing préparé avec 0,2% d'extrait de garance.

L'extrait optimisé de garance peut donc être utilisé pour colorer des produits cosmétiques en formulant l'extrait sec de manière conventionnelle. Cette méthode permet d'éviter les problèmes de conservation de l'extrait liquide, mais elle nécessite de le sécher, ce qui, dans le cas d'un extrait aqueux, peut être long et coûteux en énergie. En effet, la lyophilisation (ou toute autre méthode de séchage de l'extrait) est une étape plutôt longue par rapport au temps de préparation de l'extrait et qui consomme de l'énergie. De plus, l'extrait sec est incorporé dans un produit majoritairement composé d'eau, le même solvant qui a été évaporé dans l'étape précédente. Enfin, des problèmes de solubilité peuvent être rencontrés lors de la solubilisation d'un extrait sec dans une formulation cosmétique.

Pour pallier à ces problématiques, nous avons souhaité éliminer l'étape de séchage. Cependant, incorporer directement l'extrait brut dans le produit présente des inconvénients, notamment la concentration de l'extrait. Dans le cas de la garance par exemple, le rendement moyen est de 21,5%, pour l'extraction de 100 mg de garance dans 20 mL. La concentration approximative de l'extrait brut est donc de 1,1 mg/mL. Cela signifie que pour reproduire la concentration d'extrait sec de 0,2% dans le shampoing, il faudrait utiliser environ 180 mL d'extrait brut pour 100 g de shampoing, ce qui est impossible. Le compromis de l'utilisation d'un extrait pré-concentré, c'est-à-dire pour lequel une partie de l'eau est évaporée avant incorporation constitue une solution moins longue et moins coûteuse en eau et en énergie.

que l'évaporation à sec. Dans le cadre de cette thèse, nous avons cependant fait le choix d'évaluer la possibilité d'éliminer entièrement l'étape de séchage.

### B. Formulation directe de l'extrait biphasique de roucou dans une crème capillaire

L'extrait de roucou a été réalisé dans un système biphasique composé à 50% d'extrait aqueux et à 50% d'extrait huileux, il ne peut donc pas être séché intégralement. Une formule de crème à destination capillaire a été développée durant l'encadrement d'un projet de Master 2 de deux étudiantes. L'eau et l'huile de la crème ont été remplacées par la phase aqueuse et la phase huileuse de l'extrait afin d'obtenir une crème colorée, enrichie en roucou. Celle-ci sera utilisée comme référence pour les méthodes développées par la suite.

#### 1. Crème blanche

##### a. Formulation

La crème formulée est une émulsion huile dans l'eau, développée à partir d'ingrédients d'origine naturelle ou compatibles avec le Bio, incluant l'huile de tournesol pour la fraction huileuse (Tableau V-1). Les proportions et le protocole ont été adaptés après plusieurs essais. Trois phases ont été préparées séparément à 65°C sous agitation constante. La phase A, correspondant à la phase aqueuse, contient l'eau et l'acide sorbique, un conservateur naturel. La phase B contient de la glycérine et de la gomme xanthane, qui ont un rôle d'émulsifiants et de stabilisateurs d'émulsion, mais qui ont aussi été utilisés afin d'ajuster la viscosité de l'émulsion finale. Enfin, la phase C, correspondant à la phase huileuse, contient l'huile de tournesol (*Helianthus annuus* seed oil), mais aussi du beurre de karité (*Butyrospermum parkii* butter) afin d'améliorer la texture de l'émulsion, ainsi que deux tensioactifs contenant de l'alcool cétéarylique, utilisés pour favoriser et stabiliser l'émulsion et améliorer la texture.

**Tableau V-1 :** Composition de la crème.

| Phase | Dénomination INCI                                    | Quantité (%) |
|-------|------------------------------------------------------|--------------|
| A     | Aqua                                                 | 78,0         |
|       | Sorbic acid                                          | 0,5          |
| B     | Glycerin                                             | 3,0          |
|       | Xanthan gum                                          | 1,0          |
| C     | <i>Helianthus annuus</i> seed oil                    | 8,5          |
|       | Glyceryl stearate                                    | 4,0          |
|       | Cetearyl Wheat Straw Glycosides and Cetearyl alcohol | 2,0          |
|       | Cetearyl alcohol                                     | 2,0          |
|       | <i>Butyrospermum parkii</i> butter                   | 1,0          |

## CHAPITRE V

La phase B a été ajoutée à la phase A sous agitation constante en maintenant la température du mélange jusqu'à l'homogénéisation complète. Le mélange a ensuite été ajouté à la phase C, en maintenant l'agitation et la température constantes. L'émulsion a été mélangée jusqu'à l'obtention d'une apparence uniforme, après quoi elle a été refroidie graduellement jusqu'à température ambiante. Le pH a ensuite été ajusté entre 5 et 5,2 avec de l'acide sorbique.

### b. Caractérisation

Une crème homogène, de texture lisse et de couleur blanc brillant opaque a été obtenue (Figure V-7). Sa viscosité a été mesurée à 43 940 mPa.s et l'évaluation microscopique à un grossissement x10 a confirmé qu'une émulsion homogène avait pu être obtenue (Figure V-7).

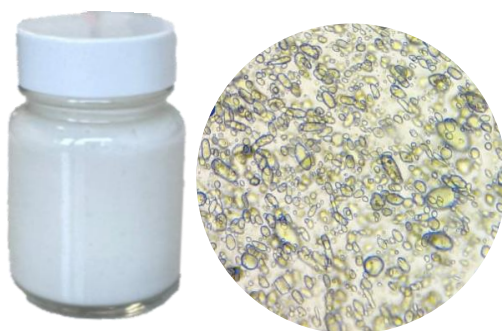


**Figure V-7** : Photographie et image microscopique à un grossissement x10 de la crème blanche.

La finesse de l'émulsion n'est pas optimale, mais aucun déphasage n'a été observé après centrifugation. De plus, la crème est restée stable pendant plus de 3 mois à température ambiante, ainsi que pendant une semaine à 42°C.

### 2. Crème enrichie en extrait de roucou

La crème enrichie en roucou a été obtenue en remplaçant l'eau et l'huile de tournesol de la crème blanche par les phases eau et huile de l'extrait optimal de roucou. Une crème jaune, de texture similaire à celle de la crème blanche a été obtenue (Figure V-8). L'ajout de l'extrait a eu un faible impact sur la viscosité, qui est légèrement plus basse que celle de la crème blanche (37 044 mPa.s), mais n'a pas modifié l'aspect observé en microscopie à un grossissement x10 (Figure V-8).



**Figure V-8:** Photographie et image microscopique à un grossissement x10 de la crème enrichie en extrait de roucou.

Comme la crème blanche, la crème enrichie en extrait de roucou s'est montrée stable après centrifugation, ainsi qu'après une conservation de 3 mois à température ambiante et d'une semaine à 42°C. Ainsi, aucun déphasage, ni aucune variation de couleur visible à l'œil nu n'ont été observés. Cette méthode de formulation de l'extrait de roucou est donc possible. Toutefois la crème obtenue contient 78% d'eau pour seulement 8,5% d'huile de tournesol, alors que l'extrait contient 50% de chaque phase. La phase eau est donc consommée plus rapidement que la phase huile, ce qui implique un déséquilibre et une utilisation non optimisée de l'extrait. De plus, si la phase huile de l'extrait est orange vif, celle-ci est diluée lors de la formulation ce qui donne à la crème une couleur jaune. Ce résultat confirme que l'utilisation directe des extraits aqueux obtenus lors de la thèse sans adapter l'étape de formulation ne permet pas d'incorporer une quantité suffisante de colorant pour donner une couleur intense au produit fini car les extraits bruts ne sont pas assez concentrés.

### C. Extraction de la garance et du roucou dans une solution de tensioactif

Afin d'obtenir des extraits bruts plus concentrés et pouvant être réalisés sans appareillage spécifique comme un micro-onde d'extraction ou un bain à ultrasons, l'extraction dans une solution de tensioactifs a été envisagée. L'ajout de tensioactifs a précédemment été décrite pour permettre l'extraction de composés peu polaires dans l'eau [12]. En effet, les tensioactifs sont des molécules amphiphiles qui ont la particularité de former des micelles lorsque leur concentration est supérieure à la concentration micellaire critique (CMC) [12]. La face interne des micelles étant apolaire, elles peuvent loger les composés non hydrophiles, permettant ainsi leur extraction [12]. L'extraction dans une solution de tensioactif est donc une méthode

## CHAPITRE V

simple, ne nécessitant pas d'investissement matériel qui pourrait faciliter l'extraction de colorants peu polaires et potentiellement permettre leur formulation directe.

Le tensioactif choisi est le décyl glucoside, un tensioactif non ionique utilisé par l'entreprise Terre de Couleur dans la formulation de ses shampoings. Celui-ci a déjà été décrit pour l'extraction de polyphénols du marc de raisin pour une valorisation cosmétique [469]. D'après la littérature, la CMC du décyl glycoside est de 0,005% (m/m) dans l'eau, mais les auteurs ont utilisé une solution à 2% pour réaliser leur extraction [469]. Deux concentrations de décyl glucoside supérieures à la CMC ont été utilisées pour l'extraction : 1% (m/m) et 5% (m/m).

Ces deux solutions ont été utilisées pour extraire le colorant de la garance et du roucou. Elles n'ont pas été utilisées sur le campêche, car nous avons déjà pu montrer que l'utilisation d'un solvant moins polaire (éthanol ou acétate d'éthyle) ne permet pas d'améliorer l'extraction de son colorant, ce qui montre que la formation de micelle n'est pas nécessaire. De plus, l'hématéine, la principale molécule responsable de la couleur de l'extrait de campêche, est sensible au pH qui modifie sa couleur, mais aussi sa stabilité [27,425]. Or, les solutions de tensioactif utilisées sont à pH 7 (décyl glucoside 1%) et 8 (décyl glucoside 5%) ce qui pourrait engendrer la dégradation de l'hématéine

Les extractions ont été réalisées en triplicats à l'abri de la lumière sous agitation au bain-marie à 38°C avec 550 mg de plante pour 20 mL de solution de décyl glucoside à 1% ou 5% pendant 10, 30 et 60 min. Les extraits obtenus ont été dilués par 2 (garance) ou par 50 (roucou) dans le solvant d'extraction pour atteindre une valeur d'absorbance qui ne sature pas. Les spectres d'absorption (350-650 nm) de tous les extraits ont ensuite été comparés afin de déterminer les conditions optimales d'extraction pour chaque plante (Figure V-9).

Pour la garance, les extraits obtenus avec le décyl glucoside à 5% ont une absorbance dans le visible légèrement plus élevée que ceux obtenus avec le décyl glucoside à 1% (Figure V-9). L'ajout de 5% de surfactant permet donc une extraction plus efficace du colorant. En revanche, le temps d'extraction impacte peu l'absorbance des extraits, ce qui suggère que l'extraction de 10 min permet déjà d'extraire la quasi-totalité du colorant (Figure V-9).

## CHAPITRE V

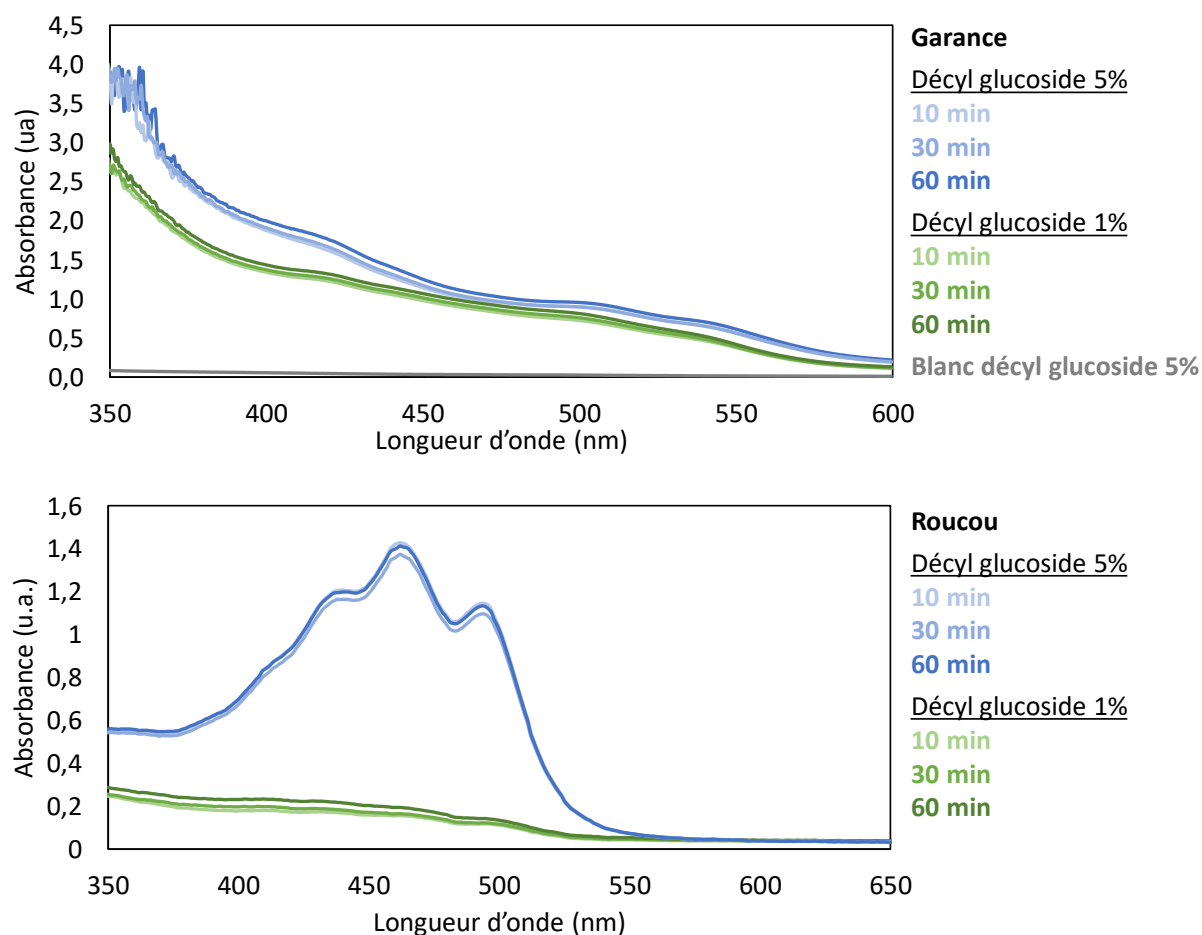


**Figure V-9 :** Spectre d'absorption (350-650 nm) des extraits de garance (en haut) et de roucou (en bas) obtenus par des extractions de 10 min (ton clair), 30 min (ton moyen) et 60 min (ton foncé) dans des solutions de décyl glucoside à 5% (bleu) et 1% (vert) et spectre d'absorption d'une solution de décyl glucoside à 5% (gris).

Les extraits de roucou obtenus avec le décyl glucoside à 5% ont une absorbance dans le visible nettement plus élevée que ceux obtenus avec le décyl glucoside à 1%. De plus, leur spectre d'absorption est caractéristique de la bixine, avec  $\lambda_{\text{max}}$  440, 463, 495 nm [330], ce qui n'est pas le cas des extraits réalisés avec le décyl glucoside à 1% (Figure V-9). Il semble donc qu'une concentration de 1% de décyl glucoside ne soit pas suffisante pour permettre l'extraction des apocaroténoïdes du roucou, mais qu'avec 5%, ces molécules puissent être extraites efficacement. Comme pour la garance, le temps d'extraction n'a pas d'impact marqué sur l'extraction du colorant (Figure V-9).

Les meilleures conditions d'extractions obtenues avec le décyl glucoside sont 10 min d'extraction avec une solution de tensioactif à 5% pour les deux plantes. L'ajout de tensioactif dans l'eau permet donc d'accéder aux colorants non hydrosolubles de la garance et du roucou par une extraction de 10 min sous agitation à faible température (38°C). Cette méthode est

donc une potentielle alternative d'extraction pour les composés non polaires, qui ne nécessite pas d'appareillage spécifique.

Ces extraits n'ont pas été formulés lors de la thèse, mais ils constituent une piste pour le développement d'ingrédients prêt à formuler pouvant être utilisés comme colorants en remplacement des pigments minéraux. La comparaison de la couleur et de l'activité des formulations classiques avec des formulations contenant ces extraits pourrait être réalisée et apporter une voie de développement possible et ne nécessitant pas d'investissement matériel. Celle-ci pourrait être élargie à d'autres plantes tinctoriales, ainsi qu'à la co-extraction de plusieurs plantes tinctoriales afin d'accéder aux différentes couleurs des gammes commercialisées par Terre de Couleur.

### **IV. Vers un procédé en une étape intégrant extraction et formulation**

Suite aux résultats obtenus précédemment, nous avons décidé de nous tourner vers des procédés permettant de réaliser conjointement l'extraction et la formulation. Deux méthodes ont été envisagées, la première basée sur la formulation directe de la poudre de plante et la seconde sur la méthode intégrant le procédé d'extraction biphasique développé pour le roucou et la formation d'une émulsion en une seule étape.

#### **A. Formulation directe des poudres de plantes**

L'efficacité de l'extraction dans le tensioactif nous a conduits à envisager la possibilité de réaliser l'extraction directement durant la formulation, en considérant la formule globale comme un solvant d'extraction aqueux contenant un mélange de tensioactifs. La formulation de shampoing de l'entreprise Terre de Couleur présentée précédemment a été réalisée une nouvelle fois, en remplaçant le pigment minéral non pas par l'extrait, mais directement par de la poudre de plante. Dans un second temps, la formulation de crème capillaire développée pour l'extrait de roucou a été enrichie directement en poudre de roucou afin de combiner l'extraction et la formulation dans un solvant contenant à la fois une phase aqueuse et une phase grasse. Enfin, un procédé assisté par ultrasons permettant en une étape l'extraction et la formulation du roucou en utilisant les conditions d'extraction optimisées dans le chapitre III a été développé.

### 1. Formulation des trois plantes dans un shampoing Terre de Couleur

La quantité de poudre de plante utilisée a été choisie afin de pouvoir comparer le shampoing enrichi en poudre de plantes au shampoing enrichi en extrait sec de garance présenté précédemment (0,2% d'extrait sec). Le rendement de l'extrait optimisé de garance étant d'environ 20%, le shampoing a été réalisé avec 1% de poudre de plante. Ainsi si l'extraction pendant la formulation est aussi efficace que la méthode optimisée, la couleur des deux shampoings devrait être proche.

Les trois shampoings ont été préparés selon le protocole fourni par Terre de Couleur et trois shampoings de couleur rose (garance), orange (roucou) et violette (campêche) ont été obtenus (Figure V-10).

Shampoings avec 1% de poudre de plante



**Figure V-10** : Photographies des shampoings réalisés avec 1% de poudre de plantes (en haut), avec de gauche à droite la garance, le roucou et le campêche.

Bien que l'hématéine soit violette en milieu basique et plutôt orange en milieu acide, la couleur violette du shampoing contenant le campêche n'est pas due à son pH, celui-ci étant compris entre 5,5 et 6,3. Il est plus probable qu'elle soit liée à un phénomène de complexation avec les argiles présentes dans le shampoing (kaolin et montmorillonite), ce phénomène ayant déjà été décrit pour la braziléine [470]. Les particules de plantes sont perceptibles sur la peau, mais n'impactent pas la texture générale du shampoing. Diminuer la granulométrie des poudres de plantes pourrait permettre d'améliorer la perception du shampoing.

#### a. Analyse de la couleur

Afin de décrire de façon objective les couleurs des shampoings, la spectrophotométrie  $L^*a^*b^*$  a été utilisée (méthode en annexe 14). Celle-ci permet de décrire une couleur dans l'espace CIELAB, caractérisé selon 3 grandeurs. La première correspond à la luminance, qui va de  $L=0$  (noir) à  $L=100$  (blanc). La seconde est le paramètre  $a$ , qui s'étend du vert ( $a$  négatif) au rouge ( $a$  positif). Enfin la troisième est le paramètre  $b$ , qui représente une échelle allant du bleu ( $b$

## CHAPITRE V

négatif) au jaune (b positif) [471]. Les coordonnées  $L^*a^*b^*$  des trois shampoings ont été obtenues avec deux réplicats par échantillon, puis transposées dans l'espace de couleur RVB afin d'obtenir un échantillon numérique de leur couleur (Tableau V-2). En parallèle, un nouveau shampoing a été formulé avec 0,2% d'extrait de garance afin de le comparer au shampoing enrichi en poudre de garance (Tableau V-2).

**Tableau V-2 :** Coordonnées  $L^*a^*b^*$  et RVB des shampoings Terre de Couleur réalisés avec l'extrait de garance ou les poudres de garance, roucou ou campêche et couleur décrite par ces paramètres.

| Shampoing         | CIELAB     |            |            | RVB   |      |      | Couleur                                                                              |
|-------------------|------------|------------|------------|-------|------|------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|                   | L          | a          | b          | Rouge | Vert | Bleu |                                                                                      |
| Garance (extrait) | 68,3 ± 0,3 | 21,1 ± 0,2 | 17,4 ± 0,2 | 213   | 152  | 136  |  |
| Garance (poudre)  | 66,9 ± 0,4 | 17,2 ± 0,1 | 14,3 ± 0,2 | 202   | 151  | 138  |                                                                                      |
| Roucou (poudre)   | 63,0 ± 0,3 | 18,8 ± 0,3 | 47,3 ± 1,1 | 205   | 138  | 67   |                                                                                      |
| Campêche (poudre) | 46,0 ± 0,6 | 9,2 ± 0,0  | -5,6 ± 0,2 | 120   | 104  | 118  |                                                                                      |

Les couleurs décrites par le spectrophotomètre sont plus foncées que celles qui ont été observées à l'œil nu. Il permet cependant de comparer différentes formulations de façon objective. La couleur du shampoing enrichi en extrait de garance semble plus intense et plus chaude que celle du shampoing enrichi en poudre de garance (Tableau V-2). D'après les coordonnées  $L^*a^*b^*$ , le shampoing préparé avec l'extrait sec est en effet plus lumineux et plus orangé (a et b plus élevés) que celui réalisé directement à partir de la poudre de plante.

Afin de comparer plus précisément les deux couleurs, le Delta E, correspondant à la différence de couleur entre les deux échantillons a été calculé (Equation V-4) [471]. La valeur du Delta E est d'autant plus élevée que la différence de couleur est facilement perceptible. Ainsi, un Delta E ≤ 1 n'est pas perceptible par l'œil humain, un Delta E compris entre 1 et 2 est perceptible par un œil expérimenté à la suite d'une observation détaillée et un Delta E > 2 est facilement perceptible [472].

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2} \quad (V-4)$$

Le Delta E obtenu entre les deux échantillons de shampoings enrichis en garance est de 5,2, ce qui correspond à une différence visible à l'œil nu. D'après ces résultats, la formulation directe de la garance ne semble pas permettre une extraction aussi efficace que la méthode d'extraction optimisée par micro-ondes.

### **b. Stabilité de la couleur**

La stabilité de la couleur des formulations a été suivie pendant 53 jours. Visuellement, les shampoings sont devenus plus ternes et plus foncés, particulièrement celui contenant la poudre de campêche. De plus, la couleur du shampoing enrichi en poudre de roucou a perdu son homogénéité après quelques jours, certainement pour des raisons de solubilité. En effet, le shampoing préparé est plutôt polaire, alors que la bixine, le principal colorant du roucou, est liposoluble ce qui pourrait expliquer le déphasage observé [330].

L'évolution de la couleur a aussi été suivie par spectrophotométrie  $L^*a^*b^*$  (deux analyses par échantillon) et le Delta E a été calculé entre chaque observation afin d'être en capacité de décrire précisément les changements observés (Figure V-11).

Pour les shampoings enrichis en garance et en roucou, la couleur évolue principalement durant les deux premiers jours, avec un Delta E à 4,6 et 3,1 respectivement. Les deux shampoings deviennent alors plus foncés (diminution de L), et celui à base de roucou devient aussi légèrement plus rouge (augmentation de a). Le shampoing enrichi en poudre de garance évolue ensuite très peu (Delta E < 1 entre chaque analyse), tandis que la variation de couleur du shampoing roucou reste perceptible (Delta E > 2), notamment après 32 et 53 jours (Delta E 2,8 et 4,0 respectivement (Figure V-11)). Le shampoing à base de campêche est celui dont la couleur évolue le plus les deux premiers jours (Delta E = 10,1). Il devient alors plus foncé (diminution de  $L^*$ ), mais aussi moins rouge (diminution de a) et plus jaune (augmentation de b), ce qui se traduit par une évolution de la couleur du violet vers un marron foncé (Figure V-11).

## CHAPITRE V

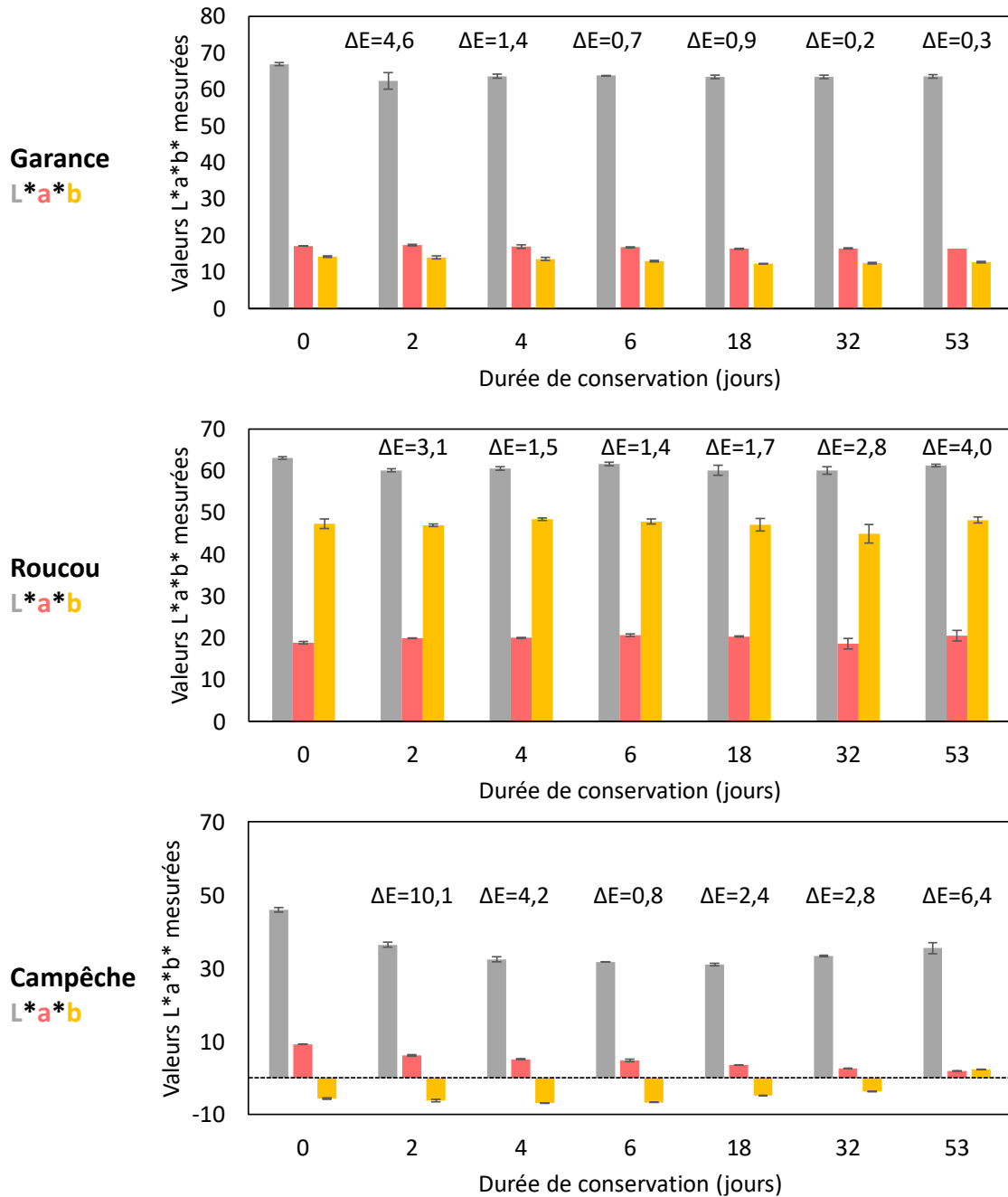


**Figure V-11** : Evolution des paramètres L\*a\*b\* des formulations enrichies en poudre de garance (haut), roucou (milieu) et campêche (bas) et Delta E calculé entre chaque mesure

D'après ces observations, il est possible que l'extraction se poursuive durant les premières heures après la formulation, ce qui pourrait expliquer la couleur plus foncée après 2 jours.

La couleur des shampoings réalisés avec de la poudre de garance et de la poudre de roucou a peu évolué durant les 51 jours suivants, ce qui montre un potentiel de cette technique d'extraction et de formulation en une étape. Cependant, l'apparition de points orange non homogénéisés dans le shampoing enrichi en poudre de roucou, correspondant au colorant apolaire qui se sépare du reste de la formulation après quelques jours de conservation montre

## CHAPITRE V

que la polarité des molécules doit être prise en compte et que cette formule de shampoing n'est pas adaptée pour la valorisation du roucou. De plus, la couleur du shampoing enrichi en poudre de campêche n'est pas assez stable pour être utilisée telle qu'elle. Cela montre que les ingrédients présents dans la formulation ne permettent pas de stabiliser l'hématéine. Des essais de stabilisation du campêche directement pendant la formulation ont été entamés en étudiant l'adsorption du campêche par les argiles utilisées dans la formule mais n'ont pas pu être achevés et n'ont donc pas été inclus dans le manuscrit.

### 2. Formulation directe du roucou dans une crème

La formulation dans le shampoing n'étant pas stable, la formulation de crème capillaire précédemment utilisée pour valoriser l'extrait biphasique de roucou a été reprise et modifiée afin d'incorporer directement la poudre de roucou lors de la formulation et de réaliser l'extraction et la formulation en une seule étape. Pour cela, chaque phase de la crème blanche a été préparée selon le protocole décrit précédemment (agitation et chauffage à 65°C pendant 30 min), excepté que 0,5 g de poudre de roucou ont été introduits pendant la préparation de la phase A (aqueuse) et de la phase C (huileuse) pour un ratio total de 1 g de plante pour 100 g de formulation (Tableau V-3). Ce ratio a été choisi car il correspond à 1 g de plante pour 8,5 g d'huile de tournesol, ce qui se rapproche du ratio optimal déterminé lors du développement de l'extraction du colorant du roucou dans le chapitre 3 (1 g/20 mL de mélange eau/huile de tournesol, 50/50), il est de plus identique au pourcentage de plante incorporé précédemment dans les shampoings. Pour cet essai, la plante a été séparée dans les phases aqueuse et huileuse afin de mimer l'extraction biphasique développée précédemment.

**Tableau V-3 :** Composition de la crème enrichie en poudre de roucou.

| Phase | Dénomination INCI                                    | Quantité (g) |
|-------|------------------------------------------------------|--------------|
| A     | Aqua                                                 | 78           |
|       | Sorbic acid                                          | 0,5          |
|       | <b><i>Bixa orellana seed</i></b>                     | 0,5          |
| B     | Glycerin                                             | 3,0          |
|       | Xanthan gum                                          | 1,0          |
| C     | <i>Helianthus annuus seed oil</i>                    | 8,5          |
|       | Glyceryl stearate                                    | 4,0          |
|       | Cetearyl Wheat Straw Glycosides and Cetearyl alcohol | 2,0          |
|       | Cetearyl alcohol                                     | 2,0          |
|       | <i>Butyrospermum parkii</i> butter                   | 1,0          |
|       | <b><i>Bixa orellana seed</i></b>                     | 0,5          |

## CHAPITRE V

Par cette méthode, deux extractions de 30 min à 65°C ont donc été réalisées en parallèle, respectivement de 0,5 g de roucou dans 78 mL d'eau acidifiée par 0,5 g d'acide sorbique lors de la préparation de la phase A et de 0,5 g de roucou dans 8,5 g d'huile de tournesol additionné de 6 g de tensioactifs et 1 g de beurre de karité lors de la préparation de la phase C. L'émulsion a ensuite été préparée en utilisant la même méthode que précédemment (ajout de B sur A, homogénéisation, puis ajout du mélange sur C et homogénéisation, toujours à 65°C). Afin de diminuer la taille des particules, l'émulsion a ensuite été homogénéisée avec un ultra-turrax. Ce dernier est un appareil d'homogénéisation fonctionnant à grande vitesse, qui permet de surcroît de réduire la taille des particules. Il a notamment déjà été décrit conjointement à l'extraction assistée par ultrasons pour diminuer la tailles des particules et améliorer la dispersion du végétal lors de l'extraction [473]. Une crème orange, plus épaisse que la crème blanche a été obtenue, avec une viscosité mesurée à 56 749 mPa.s, contre 43 940 mPa.s. L'évaluation microscopique à grossissement x10 montre une émulsion plus fine, certainement grâce à l'étape de dispersion à l'ultra-turrax (Figure 12).



**Figure V-12** : Photographie et image microscopique à un grossissement x10 de la crème enrichie en poudre de roucou. L'image microscopique au même grossissement de la crème blanche est représentée pour référence.

Cette crème enrichie en poudre de roucou est restée stable (pas de déphasage, ni de modification de la couleur) après centrifugation, ainsi qu'après conservation une semaine à 42°C et 3 mois à température ambiante. Elle s'est donc montrée aussi stable que la crème blanche et que la crème enrichie en extrait de roucou présentées précédemment. Cependant, sa couleur est plus foncée et plus orangée que celle de la crème enrichie en roucou, ce qui montre qu'elle est plus concentrée en colorant. Contrairement à ce qui a été observé dans le shampoing, la couleur de la crème est restée homogène pendant toute la durée de la conservation, probablement car le colorant est plus soluble dans cette formule que dans celle

du shampoing. De plus, la réduction de la taille des particules a amélioré la sensation sur la peau, puisque les particules ne sont plus discernables au toucher.

### B. Développement d'un procédé intégré d'extraction/formulation du roucou

Afin d'intensifier le procédé intégré d'extraction-formulation en une étape, nous avons choisi d'utiliser les conditions d'extraction optimisées dans le chapitre III de la thèse pendant la formulation. En effet, les ultrasons avaient spécifiquement été choisis car ils permettent non seulement d'intensifier l'extraction, mais peuvent aussi être utilisés pour former des émulsions [341].

Ainsi, les trois phases de la crème ont été préparées séparément comme décrit précédemment et directement incorporées dans le tube d'extraction avec 1 g de plante pour 100 g total de formule. L'émulsion et l'extraction ont alors été réalisées conjointement dans les conditions déterminées comme optimales pour l'extraction (35 min, 22,5 kHz). Une crème orange vif, moins épaisse que la crème blanche a été obtenue. La couleur de la crème montre qu'elle est plus riche en colorant que celles qui ont été préparées avec l'extrait brut de roucou ou par formulation directe de la poudre sans intensification par ultrasons (Figure V-13 A).

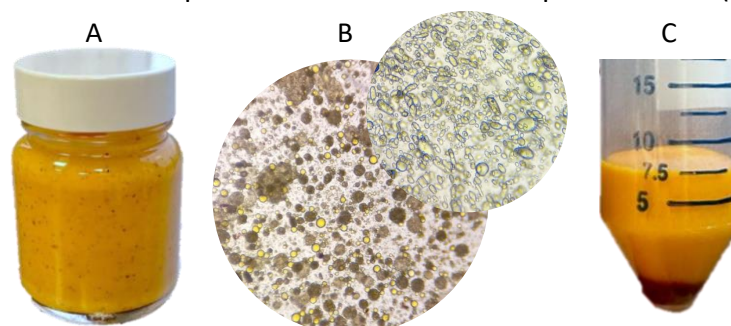


**Figure V-13 :** Représentations de la crème enrichie en poudre de roucou formulée par ultrasons. A : photographie juste après la réalisation de la crème, B : image microscopique à un grossissement x10 de la crème enrichie et de la crème blanche pour référence, C : photographie de la crème après centrifugation lors des tests de stabilité.

Les plus grosses particules de plante ont été retrouvées dans le fond du tube après l'extraction, mais l'étape de dispersion à l'Ultra-Turrax n'ayant pas été réalisée, certaines particules plus fines sont restées visibles en suspension et à la microscopie à grossissement x10 (Figure 13 B). L'évaluation microscopique a aussi révélé une émulsion plus fine que celle de la crème blanche. La présence de particules n'a pas causé le déphasage de l'émulsion, celle-ci étant stable, comme les précédentes, après centrifugation et après 3 mois de conservation

à température ambiante et une semaine à 42°C. De plus, la centrifugation a permis de séparer les particules végétales et donc d'obtenir une crème plus lisse sans causer de déphasage ni altérer la couleur, ce qui pourrait être une piste d'élimination des particules de végétal (Figure 13 C).

Le procédé assisté par ultrasons permet d'obtenir une émulsion stable, plus riche en colorant que les crèmes décrites précédemment. Cette démonstration reste une étape préliminaire qui pourrait être améliorée par une nouvelle optimisation de la formule, par la diminution de la granulométrie de la poudre de plante. La caractérisation de cette crème pourrait aussi être plus poussée, notamment pour déterminer ses potentielles activités biologiques en vue d'une valorisation cosmétique en tant que soin pour les cheveux.

## V. Conclusions

Plusieurs pistes de valorisation cosmétique ont été ouvertes dans ce chapitre (Figure V-14). La première est l'étude de deux types d'activité valorisables dans les produits cosmétiques de l'entreprise Terre de Couleur, l'activité antioxydante et l'activité anti-UV. Les extraits de roucou et de campêche ont ainsi montré des activités antioxydantes intéressantes, notamment le campêche qui s'est révélé aussi efficace que le trolox sur le test ABTS, à concentrations égales. L'extrait optimisé de garance possède une activité antioxydante plus modérée, qui ne constitue donc pas son principal intérêt cosmétique. En revanche, l'extrait de garance et celui de roucou ont montré un potentiel en tant que filtre UV qui nécessitera d'être approfondi, notamment par des mesures du comportement des extraits sous irradiation UV et par des essais après formulation.

Suite à la formulation de l'extrait optimisé de garance après l'avoir lyophilisé, ce qui constitue une voie de formulation classique pour les extraits végétaux, nous avons exploré d'autres procédés permettant d'éviter l'étape de séchage et de limiter le nombre d'étape entre la plante et le produit cosmétique, ainsi que d'économiser de l'eau et de l'énergie. La formulation directe des extraits bruts n'étant pas efficace pour des raisons de concentration finale en colorant, nous avons d'abord étudié la possibilité de développer des extraits plus concentrés, en utilisant un tensioactif utilisé en formulation cosmétique comme additif dans le solvant d'extraction. Cette méthode a effectivement permis d'obtenir des extraits riches en colorant qui peuvent être directement incorporés en formulation.

## CHAPITRE V

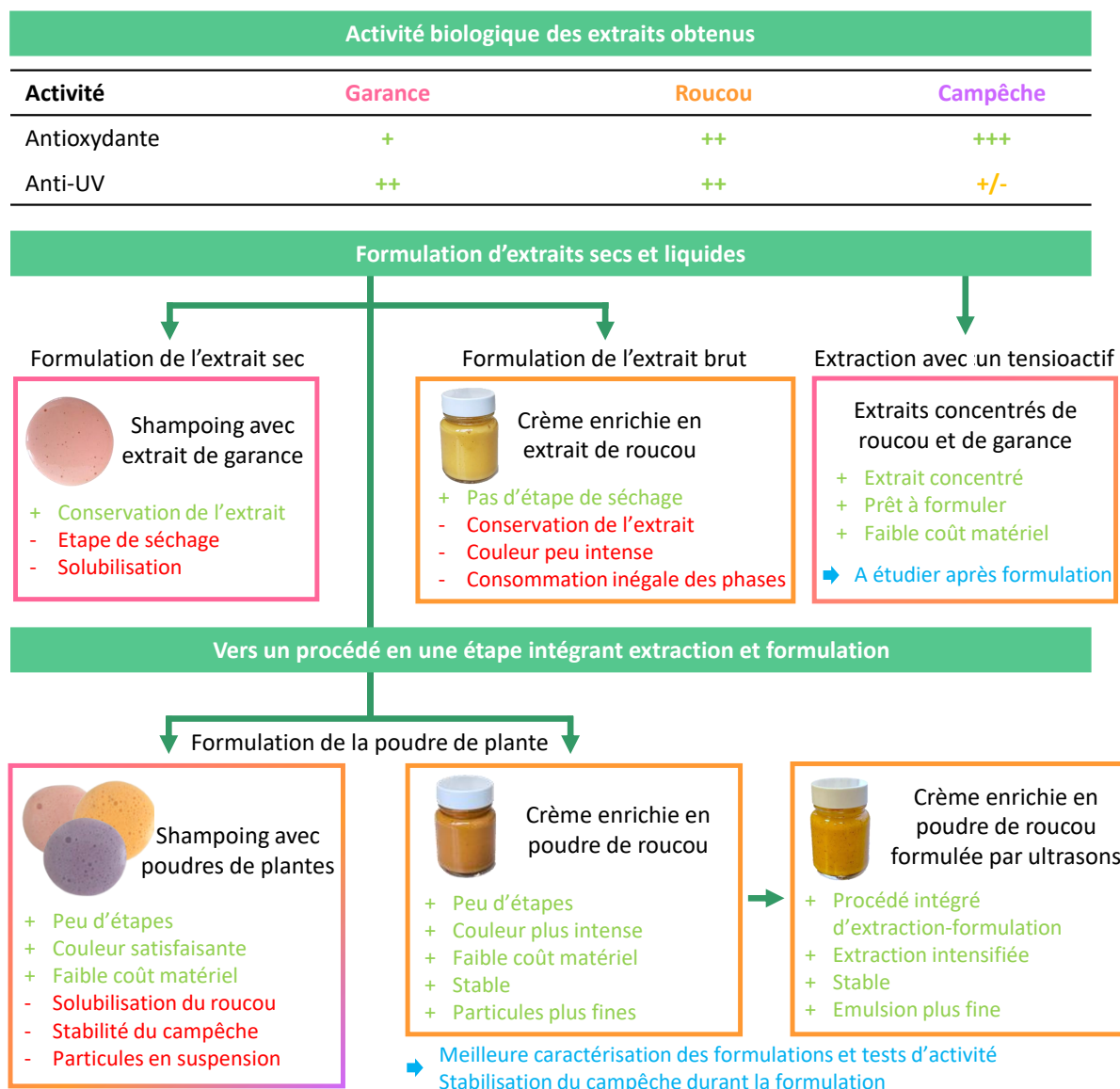


**Figure V-14 :** Figure récapitulative des résultats et perspectives relatifs aux tests d'activité et aux essais de formulations présentés dans ce chapitre.

Suite à cela, différentes méthodes ont été envisagées afin de réaliser conjointement l'extraction et la formulation des colorants issus des trois plantes. Deux bases de formulation ont pour cela été utilisées, une base de shampooing provenant de l'entreprise Terre de Couleur et une base de crème capillaire développée dans le cadre de la thèse. La formulation directe de la poudre de plante a d'abord été réalisée dans le shampooing, pour les trois plantes. Celle-ci a donné des résultats prometteurs, notamment pour la garance dont la couleur est restée stable pendant les 53 jours de l'étude. Les problèmes de stabilité déjà rencontrés précédemment pour le campêche limitent son utilisation dans ce type de formule. Des essais de stabilisation lors de la formulation par adsorption sur de l'argile et par encapsulation dans

## CHAPITRE V

les cyclodextrines ont été entamés, mais ne sont pas assez aboutis pour être présentés dans ce manuscrit. La formulation de l'extrait obtenue avec le NaDES LGH, qui a donné des résultats d'extraction et de stabilité prometteurs est une autre piste qui pourrait être envisagée dans le futur pour la valorisation du campêche.

Le shampoing enrichi en roucou a montré des problèmes de solubilité du colorant, qui ont mené à la formulation de la poudre de roucou dans la base de crème. La crème enrichie en poudre de roucou présentant la même qualité et stabilité que la base de crème, le procédé a été intensifié en utilisant les conditions d'ultrasons optimisées précédemment pour l'extraction du roucou dans le chapitre 2. La crème ainsi obtenue est de couleur orange vif et s'est montré aussi stable que la référence, malgré sa viscosité plus faible et la présence de particules végétales en suspension.

Tous ces essais constituent des pistes de valorisation qui pourront être exploitées par l'entreprise Terre de Couleur afin d'être explorées plus avant en vue de leur industrialisation. Les essais ayant été menés sur des colorants aux propriétés très différentes, les procédés développés devraient pouvoir être adaptés relativement aisément à d'autres plantes contenant d'autres types de colorants.

# Conclusion générale

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ces travaux de thèse était de développer des méthodes d'éco-extraction à l'eau permettant d'extraire des colorants et des molécules bioactives de différentes polarités à partir de trois plantes tinctoriales, puis de les valoriser dans des formulations cosmétiques en collaboration avec l'entreprise porteuse du projet, Terre de Couleur, en abordant une démarche écoresponsable visant à limiter le nombre d'étapes, la consommation d'énergie et de solvants et la production de déchets. Après une présentation des colorants végétaux et de l'état de l'art sur leur extraction à l'eau (Chapitre I), les résultats des travaux ont été séparés en 4 parties.

La première partie des travaux a été dédiée au développement d'une méthode d'extraction à l'eau permettant d'extraire des colorants moyennement polaires de la racine de la garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.). Afin d'extraire les anthraquinones, nous avons sélectionné l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) en réacteur fermé. En effet, cette méthode permet, en quelques secondes, d'atteindre une température et une pression correspondant à l'état subcritique de l'eau. Dans ces conditions, la constante diélectrique de l'eau diminue et se rapproche de celles de solvants organiques. La polarité de l'eau est alors proche de celle des solvants hydroalcooliques, considérés comme les plus adaptés à l'extraction des anthraquinones. Nous avons optimisé la méthode d'extraction assistée par micro-ondes en utilisant un plan d'expériences de type box-behnken avec une méthodologie de surface de réponse, qui permet d'étudier l'impact de chaque paramètre étudié (ici le nombre de cycles, la puissance et le ratio plante/eau), mais aussi l'impact de leurs interactions sur la réponse étudiée (ici le rendement). Suite à cette optimisation, les données ont été retravaillées afin de déterminer les conditions d'extraction permettant d'obtenir une combinaison de rendement élevé et de couleur intense. L'extrait optimal ainsi obtenu a alors été comparé à différents extraits obtenus par des méthodes conventionnelles (soxhlet, chauffage sous agitation) avec un solvant hydroalcoolique, par d'autres méthodes d'éco-extraction à l'eau (extraction par liquide pressurisé, extraction assistée par ultrasons) ou bien par MAE, en utilisant des solvants généralement utilisés pour l'extraction des anthraquinones (solvant hydroalcoolique, solution aqueuse à pH basique). La MAE à l'eau a permis d'obtenir un meilleur rendement et une couleur plus intense que toutes les autres méthodes testées. Suite à ce résultat, nous avons caractérisé la composition de phytochimique de l'extrait optimal. Pour cela, nous avons tout d'abord recherché les principales familles moléculaires attendues : les sucres parmi les métabolites primaires ainsi que les anthraquinones et autres composés phénoliques parmi les

## CONCLUSION GENERALE

métabolites spécialisés. La caractérisation phytochimique a été poursuivie par une analyse UHPLC-HRMS/MS, qui a permis de proposer des identifications pour 12 anthraquinones et 8 autres composés phénoliques, principalement des flavonoïdes.

La seconde partie des travaux a été consacrée au développement d'une méthode d'extraction permettant d'extraire simultanément des composés polaires et apolaires du roucou (*Bixa orellana* L.). En effet sa graine contient un colorant liposoluble de la famille des apocaroténoïdes, la bixine, ainsi que des composés phénoliques polaires. Pour cela, nous avons utilisé un solvant biphasique, composé d'eau et d'huile végétale, deux solvants verts communément utilisés dans les formulations cosmétiques. Cinq huiles végétales aux propriétés différentes et utilisées en cosmétique ont été étudiées afin de déterminer si les différences observées dans leur composition (déterminée par SFC-MS) ou leurs propriétés physico-chimiques (densité, tension interfaciale avec l'eau, viscosité) pouvait impacter l'extraction des composés du roucou dans la phase huile, et dans la phase eau. L'extraction assistée par ultrasons (UAE) a été sélectionnée pour cette partie des travaux, car elle facilite la diffusion des composés de la plante vers le solvant et diminue la viscosité de l'huile, ce qui permet d'intensifier l'extraction, mais aussi parce qu'elle augmente les échanges entre les phases eau et huile en diminuant la tension interfaciale et peut être utilisée pour former des émulsions, une propriété qui a été mise à profit dans la suite des travaux. L'UAE a donc été optimisée (temps, fréquence des ultrasons, ratio plante/eau), afin d'obtenir l'extrait ayant la phase huile la plus riche en colorant et la phase eau la plus riche en composés phénoliques. Ensuite, les 5 huiles ont été comparées dans les conditions d'extraction optimales, afin de déterminer leur impact sur la composition et la capacité antioxydante des deux phases. L'huile de tournesol a alors été sélectionnée, car elle permet une meilleure extraction du colorant et une activité antioxydante de la phase huile plus élevée que les autres huiles testées. Le choix de l'huile végétale n'a cependant eu qu'un impact mineur sur la composition chimique et l'activité antioxydante de la phase eau de l'extrait. Les deux phases de l'extrait optimal ont ensuite été caractérisées par UHPLC-HRMS/MS, ce qui a permis d'identifier le  $\delta$ -tocotriénol et la bixine, qui a ensuite pu être dosée, dans la phase huile et 13 composés dans la phase eau, correspondant à des ellagitannins, des acides phénoliques et à la norbixine, le dérivé hydrosoluble de la bixine. De plus, nous avons analysé la fraction volatile de l'extrait par SPME-GC-MS et identifié 9 monoterpènes et sesquiterpènes, les principaux étant l' $\alpha$ -pinène et l'isopathulénol.

## CONCLUSION GENERALE

La troisième partie des travaux a été consacrée à l'extraction, l'étude et la stabilisation du colorant hydrosoluble, mais peu stable en solution du campêche (*Haematoxylum campechianum* L.). En effet, le duramen de cet arbre contient des homoisflavonoïdes, notamment l'hématoxiline qui s'oxyde en hématéine, un colorant dont la couleur est sensible au pH et qui se dégrade rapidement en solution. L'hématéine est soluble dans l'eau, mais nous avons comparé l'extraction du campêche dans trois solvants de polarité différente car sa composition globale est peu décrite. Cela nous a permis de déterminer, après une analyse HPLC-DAD-DEDL, que l'échantillon de campêche étudié ne contient pas de composés apolaires nécessitant l'utilisation d'un solvant organique, mais aussi qu'il contient très peu de métabolites primaires polaires, généralement extraits en grande quantité à l'eau. Cette observation a été confirmée par HR-CCM en utilisant des révélateurs spécifiques des acides aminés et des sucres. Suite à cela, les teneurs en composés phénoliques et en colorant ont été mesurées et une analyse UHPLC-HRMS/MS a été réalisée afin d'identifier les principaux composés de l'extrait, l'hématoxiline, l'hématéine et l'hématoxylol B, un autre homoisflavonoïde. La caractérisation phytochimique de cette plante n'a pas pu être approfondie, mais elle permettrait de compléter la littérature, peu fournie à ce sujet. Enfin, la stabilité de l'extrait aqueux de campêche a été étudiée et plusieurs méthodes de stabilisation ont été envisagées. L'ajout d'acide gallique a permis de stabiliser l'extrait pendant les 47 h du test et l'extraction par un solvant eutectique profond naturel (NaDES) a permis non seulement de stabiliser l'extrait, mais aussi d'améliorer l'extraction du colorant. Une étude plus poussée de certaines méthodes, comme la co-extraction d'une plante riche en acide gallique, ou l'extraction par un NaDES permettrait de compléter les résultats obtenus.

La quatrième partie des travaux a été dédiée à la valorisation des extraits aqueux obtenus et au transfert vers la formulation. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié l'activité antioxydante et la capacité à filtrer les rayonnements ultraviolets des trois extraits. Ces activités ont été choisies car elles sont recherchées dans la fabrication de nombreux produits cosmétiques destinés à la peau ou aux cheveux. Nous avons ensuite envisagé différentes voies de formulation ayant pour objectif d'obtenir des produits enrichis en colorants et en actifs et stables tout en minimisant le nombre d'étapes et en valorisant au maximum les extraits générés. Nous avons commencé par la formulation classique de l'extrait sec ou de l'extrait brut, mais ces méthodes, bien qu'efficaces, ont apporté des inconvénients majeurs. La formulation de l'extrait sec demande en effet une étape de séchage, longue et coûteuse en

## CONCLUSION GENERALE

énergie, puis une étape de resolubilisation, pouvant être complexe. Au contraire, la formulation de l'extrait brut permet de s'affranchir de ces inconvénients, mais elle ne permet pas d'obtenir une concentration satisfaisante en colorant et en actifs dans le produit final. Afin de pallier ces inconvénients, nous avons développé une extraction rapide dans une solution de tensioactif, qui permet d'obtenir un extrait concentré et stable (pour le roucou et la garance) prêt à formuler. Cette méthode est rapide et a l'avantage de ne pas nécessiter d'investissement matériel. Elle pourrait donc être facilement intégrée dans les procédés de l'entreprise partenaire Terre de Couleur. Par la suite, la formulation de cet extrait et la comparaison de la couleur et de l'activité du produit obtenu avec les formulations de référence pourront être réalisées afin de compléter ces résultats. Afin de diminuer le nombre d'étapes du procédé global, nous avons ensuite combiné les étapes d'extraction et de formulation. Pour cela, les trois poudres de plantes ont été directement incorporées dans une formule de shampoing de Terre de Couleur. Cette méthode a permis une extraction efficace des colorants, mais le colorant du campêche a montré des problèmes de stabilité et celui du roucou a pu être extrait, mais a ensuite précipité, formant des particules de couleur visibles dans le shampoing. Des travaux visant à stabiliser le campêche directement pendant la formulation ont été entamés, mais ils n'ont pas abouti et n'ont pas été inclus dans le manuscrit. Cependant, la complexation avec les argiles, l'encapsulation dans les cyclodextrines et la combinaison de l'extraction et de la formulation dans un NaDES sont des pistes à poursuivre. Pour le roucou, l'extraction et la-formulation ont pu être réalisées simultanément avec succès dans une crème capillaire développée spécifiquement pour ce projet. Le système biphasique huile/eau développé pour l'extraction constitue la base de la formule de la crème et l'utilisation des ultrasons dans les conditions optimisées dans le chapitre III a permis non seulement une bonne extraction des composés d'intérêt mais également la formation de l'émulsion formant ainsi une crème onctueuse, stable et colorée. Afin de compléter ces résultats, une meilleure caractérisation des émulsions, obtenues et divers tests d'activité biologique pourraient être réalisés sur les produits finaux.

En conclusion, ces travaux présentent une approche intégrée et éco-responsable combinant le développement de méthodes d'éco-extraction innovantes et de pistes de valorisation demandant peu d'étapes, un investissement matériel minimisé et une consommation réduite d'eau et d'énergie permettant l'obtention de produits cosmétiques riches en actifs et en colorants. Ils montrent le potentiel de l'eau en tant que solvant d'extraction non seulement

## CONCLUSION GENERALE

pour les molécules hydrosolubles, mais aussi pour d'autres composés, ainsi que les possibilités qu'un tel solvant permet en termes de valorisation directe de l'extrait. L'étude de plantes à la composition et aux usages différents a montré le potentiel des ingrédients d'origine végétale en cosmétique. En effet, la caractérisation des extraits de ces trois plantes tinctoriales a montré qu'elles sont riches en colorants, mais contiennent aussi de nombreuses autres molécules qui peuvent apporter des bioactivités ou de la stabilité à l'extrait global. Par la suite, il serait par ailleurs nécessaire de se pencher sur diverses activités biologiques, mais aussi sur les potentiels risques (irritations, allergies...) des extraits ou des formules enrichies en extraits via des tests sur peau. Afin de permettre l'extraction de tous types de composés à l'eau, des méthodes d'éco-extraction ont été utilisées, l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction assistée par ultrasons. Bien que les deux puissent être utilisées à l'échelle de Terre de Couleur, elles représentent un certain investissement. L'extraction assistée par micro-ondes est particulièrement rapide et efficace, mais les conditions de température et de pression extrêmes qu'elle engendre ne peuvent pas être employées sur des molécules très thermolabiles. A l'inverse l'extraction assistée par ultrasons s'est montrée moins efficace pour extraire les anthraquinones de la garance, mais elle permet une extraction dans des conditions plus douces et a pu être utilisée aussi bien pour intensifier l'extraction que pour réaliser une émulsion. C'est donc une méthode plus versatile, qui est d'ailleurs régulièrement utilisée par les entreprises cosmétiques.

Les méthodes développées dans cette thèse ont permis d'atteindre les objectifs d'extraction des colorants et actifs des plantes tinctoriales sélectionnées par Terre de Couleur. Des voies de formulation des extraits ont été proposées pour des produits de soin et d'hygiène des cheveux, mais elles devront être améliorées et caractérisées en termes de stabilité, de sensorialité et de bioactivité. De plus, pour utiliser les extraits non plus pour colorer les produits, mais pour de la coloration capillaire, d'autres formulations devront être développées.

L'étude de l'impact de l'eau photonisée sur l'extraction, la solubilisation et la formulation des colorants et actifs végétaux pourra aussi être reprise grâce aux connaissances apportées par les travaux décrits ici et par ceux réalisés à l'ICMN en parallèle.

# Annexes

### Annexe 1 : Matériel végétal, solvants, standards et ingrédients cosmétiques

#### A. Matériel végétal

La racine de garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.), le bois de campêche (*Haematoxylum campechianum* L.) et la graine de roucou (*Bixa orellana* L.) ont été fournies sous forme de poudres (200-300 microns) par l'entreprise Terre de Couleur et proviennent de Cailleau Herboristerie (Chemillé-en-Anjou). Elles correspondent aux références GAR11, CAM 21 et ROC11 respectivement.

#### B. Solvants

L'eau ultrapure a été produite sur une système de purification d'eau Milli-Q IQ 7000 de Merck Millipore. L'éthanol absolu grade gradient pour HPLC, le méthanol, l'acétone, l'isopropanol et le dichlorométhane proviennent de VWR. L'acétonitrile, l'acide chlorhydrique à 37% et l'acétate d'éthyle proviennent de Merck, l'heptane de Carlo Erba et le dioxyde de carbone (pureté 99,7%) d'Air Liquide. Les huiles de tournesol, jojoba et coco proviennent d'Interchimie, tandis que l'huile d'olive vierge vient d'Auchan et l'huile de pépins de raisin de Tramier.

Deux solvants eutectiques profonds naturels (NaDES) ont été préparés par le Dr. Rym Attia dans le cadre d'un projet de recherche antérieur et nous ont été généreusement mis à disposition durant la thèse. Il s'agit du LGH (acide lactique/glucose, 1/5) et du PMH (L-proline/acide malique, 1/1).

#### C. Réactifs et standards

Le 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle (DPPH), le potassium persulfate, le 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), l'acétate de sodium, la néocuproïne, le chlorure de cuivre (II), le mannose, le glucose, le maltotriose, le maltopentaose, le maltoheptaose, l'hématoxyline, la série d'alcane (C8-C20), l'acide ascorbique, l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique (trolox), le réactif de Folin-Ciocalteu, le carbonate de sodium, l'acide caféique, l'acétate d'ammonium, l' $\alpha$ -naphtol, l'acide phosphorique, la rutine, l'acide chlorogénique, la catéchine, la ninhydrine, l'avobenzon et l'octinoxate proviennent de Merck. L'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) vient de Thermo Fischer Scientific et le chlorure de fer (III) provient de Janssen. L'acide formique et l'acide acétique proviennent de VWR, l'acide

## ANNEXES

sulfurique de Carlo Erba et l'hydroxyde de sodium de Riedel-de Haën. L'acide gallique vient de Honeywell et l'alizarine d'Extrasynthèse. Les cyclodextrines ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrines) proviennent de Roquette.

### D. Ingrédients cosmétiques

Les ingrédients utilisés dans les formulations cosmétiques nous ont été mis à disposition par l'entreprise Terre de Couleur et par le We Lab Cosmetic. La liste des ingrédients associés à leur fournisseur et présentée dans l'ordre alphabétique des dénominations INCI dans le Tableau A-1.

**Tableau A-1 :** Liste des ingrédients cosmétiques utilisés dans les formulations et de leurs fournisseurs

| Dénomination INCI                                    | Fournisseur     |
|------------------------------------------------------|-----------------|
| <i>Butyrospermum parkii</i> butter                   | Olvea           |
| Cetearyl alcohol                                     | BASF            |
| Cetearyl Wheat Straw Glycosides and Cetearyl alcohol | Givaudan        |
| CI 77491                                             | QUIMDIS         |
| CI 77492                                             | QUIMDIS         |
| Cocamidopropyl betaine                               | AMI ingrédients |
| Decyl glucoside                                      | AMI ingrédients |
| Disodium Laureth Sulfosuccinate                      | MASSO           |
| Glycerin                                             | Interchimie     |
| Glyceryl stearate SE                                 | BASF            |
| Kaolin                                               | Arvel           |
| Microcrystalline cellulose (and) cellulose gum       | Solliance       |
| Montmorillonite                                      | Arvel           |
| Sodium bicarbonate                                   | Quaron          |
| Sorbic acid                                          | Brenntag        |
| Xanthan gum                                          | CP Kelco        |
| Zinc coco sulfate                                    | MASSO           |

### Annexe 2 : Détail des méthodes d'extraction

#### A. Chauffage sous agitation

Les extractions par chauffage sous agitation ont été réalisées sur des agitateurs magnétiques chauffants (ME HEI-TEC, Heidolph) munis d'un thermostat. Les extractions ont été réalisées au bain-marie, afin de s'assurer de la stabilité de la température du solvant d'extraction. La température, la durée d'extraction et les quantités de plante et de solvants ont été adaptés à chaque extraction.

#### B. Soxhlet

L'extraction au soxhlet a été utilisée pour la garance des teinturiers. La plante (2,5 g) a été introduite dans une cartouche d'extraction en cellulose de 25 × 80 mm. L'extraction a été réalisée avec 100 mL de mélange éthanol/eau (50/50) à 100°C jusqu'à épuisement du végétal (4 h).

#### C. Extraction assistée par ultrasons

##### 1. Bain à ultrasons

Un bain à ultrasons (USC300T, VWR) fonctionnant à 40 kHz a été utilisé pour une partie des extractions assistées par ultrasons. La température du bain n'a pas été contrôlée durant les extractions, mais elle a été suivie afin de connaître la température réelle d'extraction. La durée d'extraction et les quantités de plante et de solvant ont été adaptées à chaque extraction.

##### 2. Réacteur R.E.U.S.

Les extractions assistées par ultrasons du roucou et le procédé d'extraction-formulation intensifié par ultrasons ont été réalisés dans un extracteur à ultrasons PEX 1N (R.E.U.S.) opérant à 150 W et jusqu'à 22,5 kHz. Trois paramètres ont été optimisés, la durée d'extraction (10, 30 et 60 min), la fréquence des ultrasons (5, 13,75 et 22,5 kHz) et le ratio plante/solvant (0,1, 0,55 et 1 g/20 mL). La température n'a pas été contrôlée durant l'extraction, mais elle a été mesurée afin de déterminer l'élévation causée par les différentes conditions de temps et de fréquence utilisées.

#### D. Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes de la garance a été réalisée sur un appareil MicroSYNTH (Milestone), contrôlé par un terminal avec le logiciel easyCONTROL. Trois paramètres ont été

optimisés, le nombre de cycles d'extraction ( $1-3 \times 30$  s), la puissance (200-1000 W) et le ratio plante/eau (0,1-1 g/20 mL). La température a été monitorée durant l'extraction, mais elle n'a pas été contrôlée.

### E. Extraction par liquide pressurisés

L'extraction par liquides pressurisés de la garance des teinturiers a été réalisée avec un appareil ASE 100 (Dionex). La poudre de plante (200 mg) a été placée dans une cellule de 5 mL et l'extraction a été réalisée à 100 bars et 60°C. Deux cycles ont été réalisés avec une extraction statique de 5 min et une purge de 200 s avec un volume de rinçage de 60%.

### F. Traitements post extraction

#### 1. Elimination du matériel végétal

Deux méthodes ont été utilisées afin de séparer la plante de l'extrait. La première est la filtration sur büchner, qui a été utilisée pour les extraits de garance. La seconde est la centrifugation, qui a été utilisée pour les extraits de roucou et de campêche.

La centrifugation des extraits de roucou et des extraits de campêche réalisés sur des volumes de 20 mL a été réalisée à l'aide d'une centrifugeuse haute vitesse Br4i (Jouan) à 12 520 *g* pendant 10 min. La centrifugation a été répétée trois fois pour les extraits de roucou à cause de la viscosité élevée de l'huile.

La centrifugation des extraits de campêche de petit volume (<2 mL) a été réalisée à l'aide d'une centrifugeuse accuSpin 21 (Fischerbrand) à 14 000 *g* pendant 3 min.

#### 2. Séchage

Les extraits ont été séchés par un lyophilisateur, un évaporateur rotatif ou sous flux d'azote en fonction des volumes travaillés et du solvant. Les extraits aqueux de garance ont été congelés dans l'azote liquide puis lyophilisés. Pour les extraits hydroalcooliques, l'éthanol a été évaporé sous évaporateur rotatif (Buchi) à 40°C et l'eau a été lyophilisée suivant la même méthode que les extraits aqueux. Les échantillons de faible volume (<2 mL) ont été évaporés à sec sous flux d'azote à température ambiante.

#### 3. Préparation d'échantillons avant analyse

Différents types d'échantillons sont décrits dans la thèse. Les extraits bruts sont les extraits analysés directement après extraction, après une étape de filtration ou de centrifugation. Ces

## ANNEXES

extraits ont parfois été dilués, notamment pour les analyses spectrophotométriques, ce qui est alors indiqué. Les extraits secs ont été repris à une concentration connue dans le solvant utilisé pour l'analyse. Leur solubilisation a été assistée par ultrasons.

Avant toute analyse, les extraits ont été filtrés sur filtre seringue PVDF de porosité 0,45  $\mu\text{m}$  et de 33 mm de diamètre.

### Annexe 3 : Spectrophotométrie UV-visible

#### A. Appareillages

Deux types d'appareillages ont été utilisés pour la spectrophotométrie UV-visible. Les analyses de la garance ainsi que les dosages basés sur la loi de Beer-Lambert (bixine et hémateïne) ont été réalisés en cuves de quartz (3,5 mL, trajet optique 10 mm) à l'aide d'un spectrophotomètre double faisceau UV-1800 (Shimadzu) contrôlé par le logiciel UVProbe 2.33. Les spectres ont été mesurés dans une gamme dépendant de l'extrait étudié, avec un pas de 0,5 nm en utilisant de réglage de vitesse moyen, correspondant à 0,2 s de temps d'accumulation. La ligne de base a été réalisée dans les mêmes conditions sur le solvant d'extraction seul.

Les analyses du roucou et du campêche, ainsi que les dosages des composés phénoliques totaux et des anthraquinones et les tests d'activités ont été réalisés sur plaques 96-puits avec un lecteur de plaques CLARIOstar PLUS (BMG Labtech) contrôlé par le logiciel MARS data analysis 2.33. Les spectres ont été réalisés avec un pas de 1 nm, avec un temps de stabilisation de 0,5 s et 22 flashes par puit.

#### B. Spectres UV-visibles des extraits

##### 1. Garance

Les spectres d'absorbance (300-700 nm) des extraits de garance ont été mesurés sur les extraits repris à 0,5 mg/mL dans leur solvant d'extraction (eau ou éthanol 50%). Pour les extraits du plan d'expériences, l'absorbance à 500 nm a ensuite été isolée.

##### 2. Roucou

L'absorbance à 465 nm de la phase huile des extraits de roucou du plan d'expériences a été mesurée sur plaque 96 puits après une dilution par 10 dans l'huile végétale. Pour les spectres d'absorption (350-650 nm) des extraits réalisés par la suite, la dilution par 10 a été réalisée dans l'heptane, un solvant compatible avec les plaques 96 puits, qui permet la dilution de la phase huile sans problème de solubilité ni de viscosité.

L'absorbance à 487 nm, utilisée pour le dosage de la bixine dans l'extrait de roucou, a été mesurée en cuve sur un extrait dilué par 20 dans l'acétone, afin de reproduire les conditions décrites dans la monographie sur les additifs alimentaires publiée par le comité mixte FAO/OMS [416] modifiées par Albuquerque et Meireles [417].

### 3. Campêche

Les spectres d'absorption (300-650 nm) utilisés pour comparer l'absorbance et la stabilité des extraits obtenus avec l'eau, l'éthanol et l'acétate d'éthyle ont été mesurés sur plaque 96 puits à partir d'extraits repris à 0,5 mg/mL dans le solvant d'extraction.

Le spectre d'absorption (350-700 nm) utilisé pour le dosage de l'hématéine a été mesuré en cuve de quartz sur un extrait repris à 0,25 mg/mL dans l'eau.

Les spectres d'absorption (300-700 nm) des extraits de campêche à différents pH ont été réalisés après une dilution par 10 dans des tampons à pH 5 (acide acétique/acétate de sodium), et à pH 6-8 (acétate d'ammonium 1M ajusté avec de l'hydroxyde de sodium 1 M ou de l'acide phosphorique 1 M).

L'absorbance à 440 nm mesurée sur les différents extraits afin de suivre leur dégradation a été obtenue sur plaque 96 puits après une dilution par 10 dans l'eau excepté dans le cas de l'acide ascorbique, pour lequel la solution d'acide ascorbique utilisée lors de l'extraction a été utilisée pour diluer l'extrait.

## Annexe 4 : Dosage des composés phénoliques totaux : test de Folin-Ciocalteu

Le dosage des composés phénoliques totaux a été réalisé par le test de Folin-Ciocalteu sur plaques 96-puits, d'après la méthode décrite par Grigoras *et al.* [322].

### A. Protocole général

Une gamme d'acide gallique entre 0,05 et 0,4 mg/mL, correspondant à une concentration dans le puits allant de 5 à 40 µg/mL, a été préparée dans l'éthanol. Dans chaque puits, 20 µL d'échantillon (gamme d'acide gallique, solvant ou extrait) et 10 µL de réactif de Folin-Ciocalteu ont été déposés en triplicats. La plaque a alors été incubée pendant 8 min à température ambiante et à l'abri de la lumière avant l'ajout de 30 µL de solution aqueuse de carbonate de sodium à 2% et de 140 µL d'eau ultrapure. La plaque a été incubée une nouvelle fois à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 2h, après quoi, elle a été lue à 760 nm dans le lecteur de plaques.

Le calcul de la concentration des composés phénoliques a été réalisé selon l'équation A-1 :

$$[\text{phénoliques}]_{\text{puits}} (\text{mg eq. AG/mL}) = \frac{(Abs_{\text{extrait}} - Abs_{\text{blanc}}) - b}{a} \quad (\text{A-1})$$

$$[\text{phénoliques}]_{\text{extrait}} (\text{mg eq. AG/g}_{\text{extrait sec}}) = \frac{[\text{phénoliques}]_{\text{puits}}}{[\text{extrait}]_{\text{puits}}} \times 1000$$

Avec [...]puits : la concentration dans le puits (correspondant à une dilution par 10 de l'extrait), Abs<sub>extrait</sub> et Abs<sub>blanc</sub> : la moyenne de l'absorbance à 760 nm des trois puits correspondant à l'extrait ou au solvant, a, le coefficient directeur de la droite d'étalonnage et b l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage

Ce protocole a été appliqué à l'extrait optimisé de garance, préparé à 10 mg/mL, soit une concentration dans le puits de 1 mg/mL.

### B. Protocole modifié

Le protocole précédent a été modifié afin de pouvoir repérer l'impact de l'absorption de l'extrait à la longueur d'onde de lecture (760 nm) et de s'en affranchir. Il a été utilisé pour les échantillons suspectés d'interférer aux longueurs d'ondes d'intérêt. Pour ce protocole, la gamme d'acide gallique et les volumes déposés sont inchangés. En revanche, tous les échantillons sont déposés en double, une première fois pour réaliser la réaction et une seconde fois en remplaçant le réactif de Folin-Ciocalteu par de l'eau distillée afin d'obtenir un témoin correspondant à l'absorbance de l'échantillon sans la réaction. Le calcul de la teneur

## ANNEXES

en composés phénoliques totaux est alors le même, mais  $Abs_{\text{blanc}}$  désigne alors l'absorbance de l'échantillon sans réactif et non le solvant seul.

Cette méthode a été utilisée pour l'extrait de campêche préparé à 5 mg/mL, soit une concentration dans le puits de 0,5 mg/mL.

### Annexe 5 : Chromatographie sur couche mince haute performance (HR-CCM)

#### A. Appareillage

Les analyses par chromatographie sur couche mince haute performance (HR-CCM) ont été réalisées sur un appareillage CAMAG équipé d'un passeur d'échantillons ATS 4, d'une cuve d'élution automatisée ADC 2, d'un dispositif de pulvérisation automatisé (Derivatizer) et d'un détecteur à la lumière blanche et ultraviolette à 254 et 366 nm (Visualizer 3). Le système est piloté par le logiciel VisionCATS 4.0. Un chauffe-plaque (TLC plate heater 3, CAMAG) a été utilisé après dérivation pour les révélations nécessitant une température spécifique de révélation. Les séparations ont été réalisées sur des plaques de gel de silice 60 F<sub>254</sub> de grade HPTLC (Merck)

#### B. Méthode acides aminés et sucres

Afin de détecter spécifiquement les sucres dans les échantillons, une méthode développée précédemment au laboratoire a été utilisée [321]. L'élution a été réalisée avec un solvant acétonitrile/eau (75/25).

La ninhydrine (1 g/L dans l'éthanol) a été utilisée pour révéler spécifiquement les acides aminés. La solution de ninhydrine a été pulvérisée sur la plaque (buse bleue, niveau 3), puis la plaque a été séchée et chauffée à 105°C pendant 3 min, permettant la révélation dans le visible de bandes rouges correspondant aux acides aminés.

Le réactif de Molisch a été utilisé pour révéler les sucres. Le réactif de Molisch comprend deux solutions : une solution éthanolique d' $\alpha$ -naphthol à 20 g/L (A) et une solution d'acide sulfurique à 5% dans l'éthanol (B). Les solutions ont été pulvérisées manuellement, car elles ne sont pas adaptées au dispositif de pulvérisation automatisé, en séchant la plaque après chaque pulvérisation. La plaque a ensuite été chauffée à 120°C pendant 5 min, pour révéler les sucres dans le visible en bleu-violet.

Cette méthode a été utilisée afin de révéler les sucres de l'extrait de garance et les acides aminés et sucres de l'extrait de campêche. Les extraits ont été préparés à 5 mg/mL dans l'eau et 5  $\mu$ L ont été déposés en chauffant la buse et à une vitesse de dépôt adaptée à la présence d'eau. Une solution contenant des standards de monosaccharides (mannose et glucose), de

maltotriose, de maltopentaose et de maltoheptaose à 5 mg/mL chacun a aussi été préparée dans l'eau et 2 µL ont été déposés.

### C. Méthode DPPH

Une méthode de révélation des composés antioxydants a été réalisée en utilisant le DPPH à 0,2% dans l'éthanol comme révélateur. La concentration en DPPH a été choisie à partir de la revue de littérature de Dewanjee *et al.* [454]. La séparation préalable des composés a été réalisée avec une méthode utilisée au laboratoire pour séparer les composés phénoliques [474]. L'élution a été réalisée avec un solvant acétate d'éthyle/eau/acide formique/acide acétique (100/27/11/11).

## Annexe 6 : Chromatographie liquide haute performance (HPLC-DAD-DEDL)

### A. Appareillage et colonne

Les séparations pour les analyses HPLC-DAD-DEDL ont été réalisées sur un appareillage Hitachi chromaster (VWR) équipé d'un passeur Hitachi chromaster 5260, d'une pompe Hitachi chromaster 5160, d'un four colonne Jetstream II plus. Toutes les séparations ont été réalisées sur une colonne Luna C18 (2) 150 × 4,6 mm, 3 µm (Phenomenex) à 40°C avec un débit de 1 mL/min.

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD) Hitachi chromaster 5430. Les analyses ont été enregistrées entre 200 et 700 nm et des longueurs d'ondes spécifiques ont été fixées pour chaque plante. Un détecteur à diffusion de lumière par évaporation (DEDL) SEDEX 85 LT-ELSD (Sedere) a aussi été utilisé avec un gain de 6. Le contrôle des appareils et le retraitement ont été réalisés sur le logiciel EZChrom Elite v.3.3.2 SP2.

### B. Analyses des extraits de garance

Les extraits de garance ont été séparés avec un gradient d'élution constitué d'eau acidifiée avec 0,1% d'acide formique (A) et d'acétonitrile acidifié avec 0,1% d'acide formique (B) (Tableau A-2) et un volume d'injection de 20 µL.

**Tableau A-2** : Gradient d'élution pour les extraits de garance

| Temps (min) | %A | %B  |
|-------------|----|-----|
| 0           | 90 | 10  |
| 3           | 90 | 10  |
| 25          | 20 | 80  |
| 26          | 20 | 80  |
| 26,1        | 0  | 100 |
| 28          | 0  | 100 |
| 28,1        | 90 | 10  |
| 35          | 90 | 10  |

Pour l'analyse des extraits obtenus durant l'essai d'extraction assistée par micro-onde préliminaire, 200µL des extraits obtenus après chaque cycle ont été prélevés, filtrés sur seringue (0,45 µm, PVDF) et injectés directement. Les chromatogrammes ont été enregistrés à 280 nm.

### C. Méthode campêche

La comparaison des profils chromatographiques des extraits de campêche obtenus avec l'eau, l'éthanol ou l'acétate d'éthyle a été réalisée avec une méthode d'analyse permettant la séparation d'une grande gamme de polarité de composés. La séparation a été obtenue avec un gradient d'élution constitué d'eau (A), d'acétonitrile (B) et d'isopropanol (C), tous acidifiés avec 0,1% d'acide formique (Tableau A-3).

**Tableau A-3** : Gradient d'élution pour les extraits de campêche

| Temps (min) | %A | %B  | %C |
|-------------|----|-----|----|
| 0           | 90 | 10  | 0  |
| 3           | 90 | 10  | 0  |
| 20          | 0  | 100 | 0  |
| 20,1        | 0  | 90  | 10 |
| 25          | 0  | 90  | 10 |
| 25,1        | 90 | 10  | 0  |
| 31          | 90 | 10  | 0  |

Pour ces analyses, les extraits ont été analysés à 5 mg/mL, excepté pour la comparaison du profil des extraits obtenus dans l'eau et la solution d'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine, pour laquelle les extraits bruts ont été injectés. Les volumes d'injection sont tous de 5  $\mu$ L. Les chromatogrammes ont été enregistrés à 280 et 450 nm.

### Annexe 7 : Chromatographie ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-DAD-HRMS)

#### A. Appareillage

Les séparations pour les analyses UHPLC-DAD-HRMS/MS ont été réalisées sur un système Ultimate 3000 RSLC équipé d'un passeur, d'une pompe binaire, d'un four colonne et d'un détecteur DAD (Thermo Fischer).

Les analyses MS et MS/MS ont été réalisées sur un spectromètre de masse en tandem quadripôle-temps de vol (UHR-Q-TOF) de la gamme maXis (Bruker) avec une source d'ionisation electrospray. Pour toutes les analyses, la pression du gaz de nébulisation a été réglée à 2 bars et le débit de gaz de séchage à 9,0 L/min, à une température de 200°C.

Les données MS et MS/MS ont été retraitées avec le logiciel DataAnalysis v.4.4 (Bruker). Les formules moléculaires ont été générées à l'aide de l'algorithme SmartFormula avec un nombre infini d'atomes de carbone, hydrogène et oxygène et un maximum d'un atome d'azote. Les formules ont été soumises à différentes bases de données publiques (PubChem, Knapsack, Lotus, SciFinder et Carotenoid database) et comparées à la littérature afin d'émettre des hypothèses d'identification.

#### B. Caractérisation de l'extrait de garance

La séparation des composés de l'extrait optimisé de garance a été réalisée sur une colonne Luna Omega C18 150 × 2,1 mm, 1,6 µm (Phenomenex) avec un gradient d'élution constitué d'eau (A) et d'acétonitrile (B) acidifiés avec 0,1% d'acide formique (3-95% B en 15 min, puis rééquilibrage à 3%B).

Les analyses MS et MS/MS ont été réalisées en modes d'ionisation positif et négatif. Les spectres de masse ont été sommés pendant 500 ms dans la gamme  $m/z$  50-1650. Les analyses MS/MS ont été obtenues par acquisition Auto-MS/MS avec 3 ions précurseurs dans la gamme de  $m/z$  150-1500. La tension du capillaire a été fixée à 1800 V en ionisation négative et 4500 V en ionisation positive. L'énergie de collision a été réglée à 25-35 eV en MS/MS<sup>-</sup>. En MS/MS<sup>+</sup>, l'énergie de collision a été fixée à 32,5 eV dans la gamme  $m/z$  150-370 pour fragmenter les flavonoïdes et anthraquinones et à 10 eV dans la gamme  $m/z$  371-1200 pour casser spécifiquement les liaisons glycosidiques (C-O) des flavonoïdes et anthraquinones glycosylés.

### C. Analyse MS des phases aqueuses des extraits de roucou pour un retraitement statistique

La séparation des composés de la phase aqueuse de l'extrait de roucou a été réalisée sur une colonne Luna Omega C18 150 × 2,1 mm, 1,6 µm (Phenomenex) avec un gradient d'élution constitué d'eau (A) et d'acétonitrile (B) acidifiés avec 0,1% d'acide formique (3-45% B en 12 min, puis 45-90% B en 2 min, puis un plateau de 2 min à 90% B avant le rééquilibrage à 3% B).

Les triplicats d'extraction ont été injectés dans un ordre randomisé avec un volume d'injection de 0,5 µL. Un échantillon de contrôle qualité, préparé avec un volume équivalent de chaque extrait, a été injecté 5 fois durant la séquence.

L'analyse MS a été réalisée en mode Full scan positif. Les spectres de masse ont été sommés pendant 1000 ms dans la gamme  $m/z$  50-1650.

### D. Caractérisation des phases aqueuses des extraits de roucou

L'échantillon de contrôle qualité a été caractérisé en acquisition Auto MS/MS en modes positif et négatif avec la même séparation préalable que pour l'analyse MS. La tension du capillaire a été fixée à 4500 V en ionisation négative et 4500 V en ionisation positive. En MS/MS<sup>+</sup>, l'acquisition Auto MS/MS a été réalisée à partir de 3 ions précurseurs avec une énergie de collision de 15 et 35 eV et en MS/MS<sup>-</sup> elle a été réalisée avec 2 ions précurseurs et une énergie de collision de 35 eV.

### E. Caractérisation des phases huile des extraits de roucou

Avant injection, la phase huile de l'extrait optimisé de roucou a été extraite par extraction liquide-liquide (LLE) avec du méthanol afin d'éliminer les composés les plus apolaires comme les acides gras. La LLE a aussi été réalisée sur l'huile de tournesol afin de déterminer l'origine (roucou ou huile de tournesol) des composés détectés.

Pour réaliser la LLE, 1 mL de méthanol a été ajouté à 1 mL d'huile ou de phase huile et les deux phases ont été mélangées par retournements afin de faciliter l'échange des molécules tout en évitant la formation d'une émulsion. La phase méthanolique (supérieure) a alors été récupérée et la phase huileuse restante a été soumise au même processus pour deux cycles supplémentaires. Les 3 mL d'extrait méthanolique obtenus ont été mélangés et 1 µL a directement été injecté en UHPLC-HRMS/MS.

## ANNEXES

La séparation a été réalisée sur une colonne Luna Omega C18, 100 × 2,1 mm, 1,6 µm (Phenomenex) avec un gradient d'élution contenant de l'eau (A) et un mélange acétonitrile/isopropanol (50/50) (B) acidifiés par 0,1% d'acide formique (10-100% B en 11 min, puis rééquilibrage à 10% B).

Les analyses MS et MS/MS ont été réalisées en mode positif uniquement. La tension du capillaire a été fixée à 4500 V. Les spectres de masse ont été sommés pendant 1000 ms dans la gamme  $m/z$  50-1650. L'acquisition Auto MS/MS a été réalisée à partir de 3 ions précurseurs avec une énergie de collision de 25 et 50 eV.

### F. Caractérisation de l'extrait de campêche

La séparation des composés de l'extrait aqueux de campêche a été réalisée sur une colonne Luna Omega C18 150 × 2,1 mm, 1,6 µm (Phenomenex) avec un gradient d'élution formé d'eau (A) et d'acétonitrile (B) acidifiés avec 0,1% d'acide formique (3-45% B en 12 min, avant le rééquilibrage à 3% B).

Les analyses MS et MS/MS ont été réalisées en modes d'ionisation positif et négatif. La tension du capillaire a été fixée à 4000 V en ionisation négative et 4500 V en ionisation positive. Les spectres de masse ont été sommés pendant 500 ms en  $MS^+$  et 1000 ms en  $MS^-$ , dans la gamme  $m/z$  50-1650. Les analyses MS/MS ont été obtenues par acquisition Auto-MS/MS avec 2 ions précurseurs dans la gamme de  $m/z$  150-1175 avec une énergie de collision à 35 eV en  $MS^-$ . En  $MS^+$ , l'acquisition Auto MS/MS a été réalisée à partir de 2 ions précurseurs dans la gamme  $m/z$  220-1210 avec une énergie de collision à 25 et 60 eV.

### Annexe 8 : SPME-GC-MS de l'extrait total de roucou

#### A. Micro-extraction sur phase solide (SPME)

L'extrait biphasique de roucou a été mélangé sur un agitateur type « vortex » afin que les deux phases aient une interface avec l'air. Ensuite, 5 g de l'extrait ont été transférés dans un vial d'espace de tête scellé et chauffés au bain-marie à 60°C pendant 45 min. Une fibre de micro-extraction sur phase solide en PDMS 100 µm (Supelco) a été mise en contact avec l'espace de tête de l'échantillon pendant 30 min sans le retirer du bain-marie. Le même procédé a été réalisé avec le solvant d'extraction seul (eau/huile de tournesol, 50/50) afin de déterminer l'origine des composés détectés (roucou ou solvant).

#### B. Analyse GC-MS

L'analyse GC-MS des échantillons a été réalisée sur un système GC 6890N (Agilent) avec un spectromètre de masse 5973 MSD (Agilent).

La désorption thermique de la fibre SPME a été réalisée pendant 10 min à 250°C en mode splitless dans l'injecteur de GC avec un insert droit de 0,75 mm. La séparation des composés a été réalisée sur une colonne HP-5 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Agilent) avec un débit d'hélium de 1 mL/min et un programme de température (40°C pendant 5 min, puis une rampe de 3°C/min jusqu'à 200°C et 15°C/min jusqu'à 250°C avec un plateau à 250°C pendant 10 min).

Les analyses MS ont été réalisées avec une source à ionisation électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV dans la gamme  $m/z$  30-300. La température de la ligne de transfert est de 250°C, celle de la source de 200°C et celle du quadripôle de 150°C. Les hypothèses d'identification ont été obtenues à partir de la comparaison des spectres de masse avec la base de données NIST 20. L'indice de rétention de chaque composé a été calculé à partir du calcul de Van Den Dool et Kratz [418] en utilisant des temps de rétention d'une série d'alcane (C8-C20) analysée dans les mêmes conditions que l'extrait. La comparaison des indices de rétention théoriques (obtenus sur la base de données NIST 20) et expérimentaux a permis d'améliorer le niveau de confiance des hypothèses d'identification.

## Annexe 9 : Analyse SFC-MS des huiles végétales utilisées pour l'extraction du roucou

La caractérisation des huiles végétales a été réalisée par SFC-MS sur un appareillage Nexera UC (Shimadzu) équipé d'une pompe à CO<sub>2</sub> (LC-30ADSF), d'une pompe à solvant (LC-30 CE), d'un passeur (SIL-30AC), de deux fours colonne (CTO-20AC), d'un DAD (SPD-M20A) et d'un régulateur de contre-pression (SFC-30A).

Les conditions d'analyse utilisées ont été choisies à partir des travaux de Lesellier *et al.* et Gros *et al.* [388,389]. Cinq colonnes C18, 4 Kinetex C18, 150 × 4,6 mm, 2,6 µm (Phenomenex) et une Accucore C18, 150 × 4,6 mm, 2,6 µm, correspondant à une longueur totale de 75 cm ont été utilisées en tandem. La température des fours colonne a été fixée à 17°C. Les analyses ont été réalisées en mode isocratique avec 88% de CO<sub>2</sub> supercritique et 12% de co-solvant acétonitrile/méthanol (90/10) pendant 80 min à 1,6 mL/min. Le régulateur de contre-pression a été fixé à 100 bars et chauffé à 60°C pour éviter les effets de la dépressurisation du CO<sub>2</sub>. Avant l'injection, les huiles ont été diluées par 200 dans un mélange acétonitrile/dichlorométhane (50/50). Le volume d'injection a été fixé à 1 µL.

Les acquisitions MS ont été réalisées avec un simple quadropôle LCMS 2020 (Shimadzu) avec une source d'ionisation APCI en mode positif dans la gamme  $m/z$  50-1000. La température de la source APCI a été fixée à 350°C, celle de la ligne de désolvatation à 250°C et celle du bloc chauffant à 200°C. Le voltage du capillaire a été fixé à 4500 V, le débit de gaz séchant à 10 mL/min et le débit de gaz nébulisant à 1,5 mL/min.

La masse de l'ion moléculaire et les pertes de neutres détectées ont été comparées à la littérature afin d'identifier les acides gras libres, les diglycérides et les triglycérides de chaque huile végétale. L'intégration des pics obtenus dans le chromatogramme TIC (Total Ion Chromatogram) a été utilisée pour réaliser une comparaison relative de la composition des huiles.

### Annexe 10 : Propriétés physico-chimiques des huiles

Les analyses des propriétés physico-chimiques ont été réalisées au laboratoire Interfaces, Confinement, Matériaux et Nanostructures (ICMN, UMR 7374) à Orléans avec l'aide d'Ariane Fournier, doctorante (2021-2024) sous la direction du Pr. Louis Hennet, elle aussi dans le cadre du projet Eau Photonisée et Innovations Cosmétique (EPIC)

#### A. Densité

La densité relative des huiles végétales a été mesurée avec un densitomètre DMA 1001 (Anton Paar). La température a été fixée à 20°C, excepté pour l'huile de coco qui n'est pas liquide à cette température et dont la densité a été mesurée à 30°C. Ces températures correspondent aux températures auxquelles les huiles ont été pesées avant l'extraction, puisque la densité a notamment été utilisée pour calculer la masse correspondant aux 10 mL nécessaires pour l'extraction en multipliant le volume cible par la densité relative de l'huile.

#### B. Tension interfaciale huile-eau

La tension interfaciale entre l'huile et l'eau a été mesurée par la méthode de la goutte pendante d'après l'équation de Young-Laplace, grâce à un tensiomètre Attension Theta (Biolin). Pour chaque huile, la tension interfaciale a été mesurée sur 5 gouttes afin de calculer la moyenne et l'écart-type des 5 analyses.

#### C. Viscosité

La viscosité des huiles végétales a été mesurée par un test de viscosité rotationnelle à l'aide d'un rhéomètre à cellule de Couette Kinexus pro (Malvern panalytical) avec une vitesse de cisaillement allant de 0,1 à 1000 s<sup>-1</sup>.

## Annexe 11 : Tests d'activité antioxydante

Plusieurs tests d'activité antioxydante ont été utilisés. Ils ont tous été réalisés par colorimétrie sur plaques 96-puits.

### A. Préparation des échantillons

Pour les tests d'activité antioxydante, l'extrait de garance a été lyophilisé puis repris à 5 mg/mL dans un mélange éthanol/eau (50/50), les deux phases de l'extrait de roucou ont été séparées et diluées par deux dans l'heptane pour la phase huile et dans l'eau pour la phase eau et l'extrait de campêche a été séché sous flux d'azote et repris à 0,5 et 0,25 mg/mL dans l'eau.

### B. DPPH

Le test DPPH a été réalisé selon une méthode adaptée de Lee *et al.* [475]. Deux solutions de trolox ont été préparées à 1 mg/mL et 0,1 mg/mL afin d'être utilisées comme référence.

Une solution de DPPH a été préparée à 0,2 mM dans l'éthanol. Ensuite, 190 µL de DPPH et 10 µL d'échantillon, correspondant à l'extrait, au trolox ou au solvant utilisé comme témoin négatif, ont été déposés en triplicats sur la plaque. Des puits contenant 10 µL d'échantillon et 190 µL d'éthanol ont aussi été déposés en triplicats, afin de soustraire l'absorbance de chaque échantillon à l'absorbance mesurée après la réaction et ainsi de s'affranchir de la couleur de l'échantillon. La plaque a été incubée à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 30 min puis a été lue à 516 nm.

L'activité DPPH a été calculée comme un pourcentage d'inhibition (Equation A-2) correspondant à la diminution de l'absorbance à 516 nm mesurée après la réaction par rapport au puit contenant seulement le radical DPPH<sup>•</sup>.

$$\text{Activité DPPH (\%)} = \frac{Abs_{DPPH^{\bullet}} - Abs_{ech}}{Abs_{DPPH^{\bullet}}} \times 100 \quad (A-2)$$

Avec Abs : absorbance à 516 nm corrigée ( $Abs_{avec\ réactif} - Abs_{sans\ réactif}$ ), ech : puits contenant le DPPH et l'échantillon dont l'activité est mesurée, DPPH<sup>•</sup> : puits contenant le radical DPPH et de l'éthanol.

### C. ABTS

Le test ABTS a été réalisé selon un protocole modifié à partir de Tagliazucchi *et al.* [476]. Le réactif a été préparé à partir d'une solution d'ABTS à 7 mM et d'une solution à 2,45 mM de potassium persulfate. Un volume de 2 mL de chaque solution a été mélangé pendant 16 h à température ambiante à l'abri de la lumière. La solution obtenue a ensuite été complétée

## ANNEXES

jusqu'à 20 mL avec un mélange éthanol/eau (25/75) pour obtenir le réactif. En parallèle, deux solutions standard de trolox ont été préparées à 1 et 0,1 mg/mL.

Ensuite, 190 µL de réactif et 10 µL d'échantillon ont été déposés en triplicats sur la plaque. Comme précédemment, des puits ont été préparés avec 10 µL d'échantillon et 190 µL d'eau afin de soustraire l'absorbance de l'échantillon sans réactif à l'absorbance de l'échantillon après la réaction. La plaque a été incubée 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière et lue à 734 nm. L'activité ABTS a été calculée de la même manière que l'activité DPPH.

### D. FRAP

La solution de réactif FRAP a été préparée à partir de trois solutions en proportion 10/1/1, correspondant respectivement à un tampon acétate de sodium à 300 mM (pH 3,6), une solution de chlorure de fer (III) à 20 mM et une solution de TPTZ à 10 mM préparée dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 40 mM.

Une gamme de trolox a été préparée entre 0,1 et 1 mg/mL afin de pouvoir déterminer l'absorbance correspondant à 100% d'inhibition, correspondant à une inflexion de la droite  $Abs=f([trolox])$ . L'activité maximale du trolox a ainsi été déterminée comme étant obtenue à 0,8 mg/mL. En effet, dans ce test, on observe l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde fixée et non sa diminution.

Sur la plaque, 190 µL de réactif et 10 µL d'échantillon ont été déposés en triplicats. Comme pour les tests précédents, les échantillons ont aussi été déposés sans réactif, celui-ci étant alors remplacé par le tampon. La plaque a été incubée pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière puis lue à 590 nm.

L'activité FRAP a été calculée comme la capacité de réduction du fer ferrique en fer ferreux, par rapport à celle de la référence correspondant à 100% d'activité (Equation A-3).

$$Activité\ FRAP\ (\%) = 1 - \frac{Abs_{T_{max}} - Abs_{ech}}{Abs_{T_{max}}} \times 100 \quad (A-3)$$

Avec Abs : absorbance à 590 nm, ech : puits contenant le réactif et l'échantillon dont l'activité est mesurée,  $T_{max}$  : puit contenant le réactif et le trolox à une concentration correspondant à 100% d'inhibition.

### E. CUPRAC

La solution de réactif de CUPRAC a été préparée à partir du mélange de trois solutions au ratio 1/1/1, correspondant respectivement à un tampon ammonium acétate à 1 M (pH 7), une

## ANNEXES

solution éthanolique de néocuproïne à 7,5 mM et une solution de chlorure de cuivre (II) à 10 mM préparée dans le tampon.

L'activité maximale du trolox a été déterminée à 1 mg/mL, en utilisant la même méthode que pour le test FRAP. Le trolox a donc été préparé à 0,5 et 1 mg/mL. Ensuite, 190  $\mu$ L de réactif et 10  $\mu$ L d'échantillon ont été déposés en triplicats. Comme pour les tests précédents, les échantillons ont aussi été déposés sans réactif, celui-ci étant alors remplacé par le tampon ammonium acétate. La plaque a été incubée pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière puis lue à 450 nm. L'activité CUPRAC a été mesurée selon le même calcul que l'activité FRAP.

## Annexe 12 : Valeurs $EE \times I$ utilisées pour le calcul du SPF

Les valeurs de la  $EE \times I$  (Tableau A-4) ont été déterminées par Sayre *et al* [466].

**Tableau A-4** : Valeurs de  $EE \times I$  [466].

| Abs (nm) | $EE \times I$ |
|----------|---------------|
| 290      | 0,0150        |
| 295      | 0,0817        |
| 300      | 0,2874        |
| 305      | 0,3278        |
| 310      | 0,1864        |
| 315      | 0,0837        |
| 320      | 0,0180        |

## Annexe 13 : Formulation du shampoing de Terre de Couleur

Pour des raisons de confidentialité, le protocole complet de la préparation du shampoing de l'entreprise Terre de Couleur ne peut pas être divulgué. Cependant, les ingrédients et la proportion par rapport à la formule totale de chaque phase de préparation sont présentés dans le Tableau A-5.

**Tableau A-5 : Formulation du shampoing de Terre de Couleur.**

| Phases | Dénomination INCI                              | Proportion (%) |
|--------|------------------------------------------------|----------------|
| 1      | Zinc coco sulfate                              | 31,0           |
|        | Cocamidopropyl betaine                         |                |
|        | Disodium Laureth Sulfosuccinate                |                |
| 2      | Aqua <sup>1</sup>                              | 37,5           |
| 3      | Base de crème <sup>2</sup>                     | 1,2            |
|        | Tensioactif <sup>2</sup>                       |                |
| 4      | Kaolin                                         | 8,2            |
|        | Montmorillonite                                |                |
|        | CI 77492                                       |                |
|        | CI 77491                                       |                |
| 5      | Aqua <sup>1</sup>                              | 15,5           |
|        | Microcrystalline cellulose (and) cellulose gum |                |
| 6      | Aqua <sup>1</sup>                              | 4,2            |
|        | Huiles essentielles <sup>3</sup>               |                |
| 7      | Decyl glucoside                                | 2,5            |
|        | Sorbic acid                                    |                |
|        | Sodium bicarbonate                             |                |

<sup>1</sup>Proportion totale d'eau : 55,5%

<sup>2</sup>Détails de l'ingrédient non divulgués pour des raisons de confidentialité

<sup>3</sup>Huiles essentielles non utilisées dans les formulations réalisées pour la thèse

### Annexe 14 : Spectrophotométrie $L^*a^*b^*$

Les analyses de spectrophotométrie  $L^*a^*b^*$  ont été réalisées au laboratoire Interfaces, Confinement, Matériaux et Nanostructures (ICMN, UMR 7374) à Orléans avec l'aide d'Ariane Fournier.

#### A. Appareillage

Les analyses de spectrophotométrie  $L^*a^*b^*$  ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre AvaSep-ULS2048CL-EVO-RS (Avantes StarLine), muni d'une sphère d'intégration Avasphere-50-LS-NAL-12V (Avantes) et contrôlé par le logiciel Avasoft8. Un support a été réalisé sur mesure par impression 3D afin de déposer une quantité équivalente de crème à chaque analyse. Celui-ci correspond à un moule rond à fond plat de 1 cm de diamètre et 2 mm de profondeur.

#### B. Analyses

Pour chaque analyse, la crème testée a été déposée sur le support et lissée par arasage. Chaque analyse a été réalisée avec un temps d'intégration de 4 ms et répétée 3 fois sur des échantillons de crème différents afin de déterminer l'écart-type de la mesure.

1. Martins, A.M.; Marto, J.M. A Sustainable Life Cycle for Cosmetics: From Design and Development to Post-Use Phase. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **2023**, *35*, 101178, doi:10.1016/j.scp.2023.101178.
2. Cavalcanti, R.N.; Forster-Carneiro, T.; Gomes, M.T.M.S.; Rostagno, M.A.; Prado, J.M.; Meireles, M.A.A. Uses and Applications of Extracts from Natural Sources. In *Natural Product Extraction: Principles and Applications*; Rostagno, M.A., Prado, J.M., Eds.; Green Chemistry; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2013; pp. 1–57 ISBN 978-1-84973-606-0.
3. De Souza Mesquita, L.M.; Martins, M.; Pisani, L.P.; Ventura, S.P.M.; De Rosso, V.V. Insights on the Use of Alternative Solvents and Technologies to Recover Bio-based Food Pigments. *Comp Rev Food Sci Food Safe* **2021**, *20*, 787–818, doi:10.1111/1541-4337.12685.
4. Rodríguez-Mena, A.; Ochoa-Martínez, L.A.; González-Herrera, S.M.; Rutiaga-Quíñones, O.M.; González-Laredo, R.F.; Olmedilla-Alonso, B. Natural Pigments of Plant Origin: Classification, Extraction and Application in Foods. *Food Chemistry* **2023**, *398*, 133908, doi:10.1016/j.foodchem.2022.133908.
5. Davies, K.M. An Introduction to Plant Pigments in Biology and Commerce. In *Plant Pigments and their Manipulation*; Davies, K.M., Ed.; Annual Plant Reviews online; John Wiley & Sons, Ltd, 2018; Vol. 14, pp. 1–22 ISBN 978-1-119-31299-4.
6. Shen, N.; Ren, J.; Liu, Y.; Sun, W.; Li, Y.; Xin, H.; Cui, Y. Natural Edible Pigments: A Comprehensive Review of Resource, Chemical Classification, Biosynthesis Pathway, Separated Methods and Application. *Food Chemistry* **2023**, *403*, 134422, doi:10.1016/j.foodchem.2022.134422.
7. Gaboriaud-Kolar, N.; Nam, S.; Skaltsounis, A.-L. A Colorful History: The Evolution of Indigoids. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 99*; Kinghorn, A.D., Falk, H., Kobayashi, J., Eds.; Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; Springer International Publishing: Cham, 2014; Vol. 99, pp. 69–145 ISBN 978-3-319-04899-4.
8. Yadav, S.; Tiwari, K.S.; Gupta, C.; Tiwari, M.K.; Khan, A.; Sonkar, S.P. A Brief Review on Natural Dyes, Pigments: Recent Advances and Future Perspectives. *Results in Chemistry* **2023**, *5*, 100733, doi:10.1016/j.rechem.2022.100733.
9. Brudzyńska, P.; Sionkowska, A.; Grisel, M. Plant-Derived Colorants for Food, Cosmetic and Textile Industries: A Review. *Materials* **2021**, *14*, 3484, doi:10.3390/ma14133484.
10. Chemat, F.; Abert-Vian, M.; Fabiano-Tixier, A.S.; Strube, J.; Uhlenbrock, L.; Gunjevic, V.; Cravotto, G. Green Extraction of Natural Products. Origins, Current Status, and Future Challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *118*, 248–263, doi:10.1016/j.trac.2019.05.037.
11. Chemat, F.; Vian, M.A.; Cravotto, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *IJMS* **2012**, *13*, 8615–8627, doi:10.3390/ijms13078615.
12. Lajoie, L.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Chemat, F. Water as Green Solvent: Methods of Solubilisation and Extraction of Natural Products—Past, Present and Future Solutions. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1507, doi:10.3390/ph15121507.
13. Humphrey, A.M. Chlorophyll. *Food Chemistry* **1980**, *5*, 57–67, doi:10.1016/0308-8146(80)90064-3.
14. Schoefs, B. Chlorophyll and Carotenoid Analysis in Food Products. Properties of the Pigments and Methods of Analysis. *Trends in Food Science & Technology* **2002**, *13*, 361–371, doi:10.1016/S0924-2244(02)00182-6.
15. Vázquez-Ortega, F.; Lagunes, I.; Trigos, Á. Cosmetic Dyes as Potential Photosensitizers of Singlet Oxygen Generation. *Dyes and Pigments* **2020**, *176*, 108248, doi:10.1016/j.dyepig.2020.108248.
16. Cui, H.; Xie, W.; Hua, Z.; Cao, L.; Xiong, Z.; Tang, Y.; Yuan, Z. Recent Advancements in Natural Plant Colorants Used for Hair Dye Applications: A Review. *Molecules* **2022**, *27*, 8062, doi:10.3390/molecules27228062.
17. Tanaka, Y.; Sasaki, N.; Ohmiya, A. Biosynthesis of Plant Pigments: Anthocyanins, Betalains and Carotenoids. *Plant J* **2008**, *54*, 733–749, doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x.
18. Vankar, P.S.; Shukla, D. Spectrum of Colors from *Reseda Luteola* and Other Natural Yellow Dyes. *Journal of Textile Engineering & Fashion Technology* **2018**, *4*, doi:10.15406/jteft.2018.04.00127.
19. Baldim, J.L.; Rosa, W.; Santos, M.F.C.; Chagas-Paula, D.A.; Lago, J.H.G.; Soares, M.G. Homoisoflavonoids from *Caesalpinia* Spp.: A Closer Look at Chemical and Biological Aspects. In *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*; Justino, G.C., Ed.; InTech, 2017 ISBN 978-953-51-3423-7.
20. Davies, K.M. Important Rare Plant Pigments. In *Plant Pigments and their Manipulation*; Davies, K.M., Ed.; Annual Plant Reviews online; John Wiley & Sons, Ltd, 2018; Vol. 14, pp. 214–247 ISBN 978-1-119-31299-4.
21. Cruz, L.; Basílio, N.; Mateus, N.; De Freitas, V.; Pina, F. Natural and Synthetic Flavylum-Based Dyes: The Chemistry Behind the Color. *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 1416–1481, doi:10.1021/acs.chemrev.1c00399.
22. Phan, K.; Raes, K.; Van Speybroeck, V.; Roosen, M.; De Clerck, K.; De Meester, S. Non-Food Applications of Natural Dyes Extracted from Agro-Food Residues: A Critical Review. *Journal of Cleaner Production* **2021**, *301*, 126920, doi:10.1016/j.jclepro.2021.126920.

## REFERENCES

23. Luiza Koop, B.; Nascimento Da Silva, M.; Diniz Da Silva, F.; Thayres Dos Santos Lima, K.; Santos Soares, L.; José De Andrade, C.; Ayala Valencia, G.; Rodrigues Monteiro, A. Flavonoids, Anthocyanins, Betalains, Curcumin, and Carotenoids: Sources, Classification and Enhanced Stabilization by Encapsulation and Adsorption. *Food Research International* **2022**, *153*, 110929, doi:10.1016/j.foodres.2021.110929.
24. Bota, S.; Indrie, L. Natural Dye Extraction and Dyeing of Different Fibers: A Review. In *Innovative and Emerging Technologies for Textile Dyeing and Finishing*; Rather, L.J., Haji, A., Shabbir, M., Eds.; Scrivener Publishing LLC, 2021; pp. 113–136 ISBN 978-1-119-71014-1.
25. Boga, C.; Delpivo, C.; Ballarin, B.; Morigi, M.; Galli, S.; Micheletti, G.; Tozzi, S. Investigation on the Dyeing Power of Some Organic Natural Compounds for a Green Approach to Hair Dyeing. *Dyes and Pigments* **2013**, *97*, 9–18, doi:10.1016/j.dyepig.2012.11.020.
26. Lech, K.; Fornal, E. A Mass Spectrometry-Based Approach for Characterization of Red, Blue, and Purple Natural Dyes. *Molecules* **2020**, *25*, 3223, doi:10.3390/molecules25143223.
27. Ngamwonglumlert, L.; Devahastin, S. Brazilin as an Alternative Pigment: Isolation, Characterization, Stability Enhancement and Food Applications. *Food Chemistry* **2023**, *398*, 133898, doi:10.1016/j.foodchem.2022.133898.
28. Ngamwonglumlert, L.; Devahastin, S.; Chiewchan, N.; Raghavan, G.S.V. Color and Molecular Structure Alterations of Brazilin Extracted from *Caesalpinia Sappan* L. under Different pH and Heating Conditions. *Sci Rep* **2020**, *10*, 12386, doi:10.1038/s41598-020-69189-3.
29. Ewon, K.; Bhagya, A.S. A Review on Golden Species of Zingiberaceae Family around the World: Genus *Curcuma*. *Afr. J. Agric. Res.* **2019**, *14*, 519–531, doi:10.5897/AJAR2018.13755.
30. Flors, C.; Nonell, S. Light and Singlet Oxygen in Plant Defense Against Pathogens: Phototoxic Phenalenone Phytoalexins. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 293–300, doi:10.1021/ar0402863.
31. Duval, J.; Pecher, V.; Poujol, M.; Lesellier, E. Research Advances for the Extraction, Analysis and Uses of Anthraquinones: A Review. *Industrial Crops and Products* **2016**, *94*, 812–833, doi:10.1016/j.indcrop.2016.09.056.
32. Wang, P.; Wei, J.; Hua, X.; Dong, G.; Dziedzic, K.; Wahab, A.; Efferth, T.; Sun, W.; Ma, P. Plant Anthraquinones: Classification, Distribution, Biosynthesis, and Regulation. *Journal of Cellular Physiology* *n/a*, doi:10.1002/jcp.31063.
33. Willemen, H.; van den Meijdenberg, G.J.P.; van Beek, T.A.; Derksen, G.C.H. Comparison of Madder (*Rubia Tinctorum* L.) and Weld (*Reseda Luteola* L.) Total Extracts and Their Individual Dye Compounds with Regard to Their Dyeing Behaviour, Colour, and Stability towards Light. *Coloration Technol* **2019**, *135*, 40–47, doi:10.1111/cote.12384.
34. Sadiq, U.; Gill, H.; Chandrapala, J. Temperature and pH Stability of Anthraquinones from Native Aloe Vera Gel, Spray-Dried and Freeze-Dried Aloe Vera Powders during Storage. *Foods* **2022**, *11*, 1613, doi:10.3390/foods11111613.
35. Remali, J.; Sahidin, I.; Aizat, W.M. Xanthone Biosynthetic Pathway in Plants: A Review. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 809497, doi:10.3389/fpls.2022.809497.
36. Gunter, N.V.; Teh, S.S.; Lim, Y.M.; Mah, S.H. Natural Xanthenes and Skin Inflammatory Diseases: Multitargeting Mechanisms of Action and Potential Application. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 594202, doi:10.3389/fphar.2020.594202.
37. Lattanzio, V. Phenolic Compounds: Introduction. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M., Eds.; 2013; pp. 1543–1580 ISBN 978-3-642-22143-9.
38. Haslam, E. Thoughts on Thearubigins. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 61–73, doi:10.1016/S0031-9422(03)00355-8.
39. Abudurehman, B.; Yu, X.; Fang, D.; Zhang, H. Enzymatic Oxidation of Tea Catechins and Its Mechanism. *Molecules* **2022**, *27*, 942, doi:10.3390/molecules27030942.
40. Li, S.; Lo, C.-Y.; Pan, M.-H.; Lai, C.-S.; Ho, C.-T. Black Tea: Chemical Analysis and Stability. *Food Funct.* **2013**, *4*, 10–18, doi:10.1039/C2FO30093A.
41. Engelhardt, U.H. Tea Chemistry – What Do and What Don't We Know? – A Micro Review. *Food Research International* **2020**, *132*, 109120, doi:10.1016/j.foodres.2020.109120.
42. Glagoleva, A.Y.; Shoeva, O.Y.; Khlestkina, E.K. Melanin Pigment in Plants: Current Knowledge and Future Perspectives. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 770, doi:10.3389/fpls.2020.00770.
43. Buchweitz, M. Natural Solutions for Blue Colors in Food. In *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*; Carle, R., Schweiggert, R.M., Eds.; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing, 2016; pp. 355–384 ISBN 978-0-08-100371-8.
44. Polturak, G.; Aharoni, A. “La Vie En Rose”: Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments. *Molecular Plant* **2018**, *11*, 7–22, doi:10.1016/j.molp.2017.10.008.
45. Azeredo, H.M.C. Betalains: Properties, Sources, Applications, and Stability – a Review. *Int J of Food Sci Tech* **2009**, *44*, 2365–2376, doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x.
46. Jespersen, L.; Strømdahl, L.D.; Olsen, K.; Skibsted, L.H. Heat and Light Stability of Three Natural Blue Colorants for Use in Confectionery and Beverages. *Eur Food Res Technol* **2005**, *220*, 261–266, doi:10.1007/s00217-004-1062-7.
47. Roberts, M.F.; Strack, D.; Wink, M. Biosynthesis of Alkaloids and Betalains. In *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*; Wink, M., Ed.; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2010; pp. 20–91 ISBN 978-1-4443-2050-3.

## REFERENCES

48. Patel, P. A Bird's Eye View on a Therapeutically 'Wonder Molecule': Berberine. *Phytomedicine Plus* **2021**, *1*, 100070, doi:10.1016/j.phyplu.2021.100070.
49. Mackraj, I.; Govender, T.; Gathiram, P. Sanguinarine. *Cardiovascular Drug Reviews* **2008**, *26*, 75–83, doi:10.1111/j.1527-3466.2007.00037.x.
50. Pérez-Arantegui, J. Not Only Wall Paintings—Pigments for Cosmetics. *Archaeol Anthropol Sci* **2021**, *13*, 189, doi:10.1007/s12520-021-01399-w.
51. Scott, D.A. A Review of Ancient Egyptian Pigments and Cosmetics. *Studies in Conservation* **2016**, *61*, 185–202, doi:10.1179/2047058414Y.0000000162.
52. Lucas, A. Cosmetics, Perfumes and Incense in Ancient Egypt. *The Journal of Egyptian Archaeology* **1930**, *16*, 41, doi:10.2307/3854332.
53. Benkhaya, S.; M'rabet, S.; El Harfi, A. Classifications, Properties, Recent Synthesis and Applications of Azo Dyes. *Heliyon* **2020**, *6*, e03271, doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03271.
54. Alzain, H.; Kalimugogo, V.; Hussein, K. A Review of Environmental Impact of Azo Dyes. *Int J Res Rev* **2023**, *10*, 64–689, doi:10.52403/ijrr.20230682.
55. Ardila-Leal, L.D.; Poutou-Piñales, R.A.; Pedroza-Rodríguez, A.M.; Quevedo-Hidalgo, B.E. A Brief History of Colour, the Environmental Impact of Synthetic Dyes and Removal by Using Laccases. *Molecules* **2021**, *26*, 3813, doi:10.3390/molecules26133813.
56. Saxena, S.; Raja, A.S.M. Natural Dyes: Sources, Chemistry, Application and Sustainability Issues. In *Roadmap to Sustainable Textiles and Clothing*; Muthu, S.S., Ed.; Textile Science and Clothing Technology; Springer Singapore: Singapore, 2014; pp. 37–80 ISBN 978-981-287-064-3.
57. Varvaresou, A.; Papageorgiou, S.; Tsirivas, E.; Protopapa, E.; Kintziou, H.; Kefala, V.; Demetzos, C. Self-preserving Cosmetics. *Intern J of Cosmetic Sci* **2009**, *31*, 163–175, doi:10.1111/j.1468-2494.2009.00492.x.
58. Radice, M.; Manfredini, S.; Ziosi, P.; Dissette, V.; Buso, P.; Fallacara, A.; Vertuani, S. Herbal Extracts, Lichens and Biomolecules as Natural Photo-Protection Alternatives to Synthetic UV Filters. A Systematic Review. *Fitoterapia* **2016**, *114*, 144–162, doi:10.1016/j.fitote.2016.09.003.
59. *Règlement (CE) n o 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques (refonte) (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)*; 2009; Vol. 342;.
60. COSMILE Europe Available online: <https://cosmileeurope.eu/fr/inci/> (accessed on 14 August 2024).
61. Gulcin, İ. Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. *Arch Toxicol* **2020**, *94*, 651–715, doi:10.1007/s00204-020-02689-3.
62. Prakash, B.; Kumar, A.; Singh, P.P.; Songachan, L.S. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phytochemicals. In *Functional and Preservative Properties of Phytochemicals*; Prakash, B., Ed.; Academic Press, 2020; pp. 1–45 ISBN 978-0-12-818593-3.
63. Bibi Sadeer, N.; Montesano, D.; Albrizio, S.; Zengin, G.; Mahomoodally, M.F. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants* **2020**, *9*, 709, doi:10.3390/antiox9080709.
64. Hoang, H.T.; Moon, J.-Y.; Lee, Y.-C. Natural Antioxidants from Plant Extracts in Skincare Cosmetics: Recent Applications, Challenges and Perspectives. *Cosmetics* **2021**, *8*, 106, doi:10.3390/cosmetics8040106.
65. Dini, I.; Laneri, S. The New Challenge of Green Cosmetics: Natural Food Ingredients for Cosmetic Formulations. *Molecules* **2021**, *26*, 3921, doi:10.3390/molecules26133921.
66. Carreón-Hidalgo, J.P.; Franco-Vásquez, D.C.; Gómez-Linton, D.R.; Pérez-Flores, L.J. Betalain Plant Sources, Biosynthesis, Extraction, Stability Enhancement Methods, Bioactivity, and Applications. *Food Research International* **2022**, *151*, 110821, doi:10.1016/j.foodres.2021.110821.
67. Ak, T.; Gülçin, İ. Antioxidant and Radical Scavenging Properties of Curcumin. *Chemico-Biological Interactions* **2008**, *174*, 27–37, doi:10.1016/j.cbi.2008.05.003.
68. Cruz, A.M.; Gonçalves, M.C.; Marques, M.S.; Veiga, F.; Paiva-Santos, A.C.; Pires, P.C. In Vitro Models for Anti-Aging Efficacy Assessment: A Critical Update in Dermocosmetic Research. *Cosmetics* **2023**, *10*, 66, doi:10.3390/cosmetics10020066.
69. Krutmann, J.; Bouloc, A.; Sore, G.; Bernard, B.A.; Passeron, T. The Skin Aging Exposome. *Journal of Dermatological Science* **2017**, *85*, 152–161, doi:10.1016/j.jdermsci.2016.09.015.
70. Binic, I.; Lazarevic, V.; Ljubenovic, M.; Mojsa, J.; Sokolovic, D. Skin Ageing: Natural Weapons and Strategies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**, *2013*, 1–10, doi:10.1155/2013/827248.
71. Campa, M.; Baron, E. Anti-Aging Effects of Select Botanicals: Scientific Evidence and Current Trends. *Cosmetics* **2018**, *5*, 54, doi:10.3390/cosmetics5030054.
72. Papaemmanouil, C.D.; Peña-García, J.; Banegas-Luna, A.J.; Kostagianni, A.D.; Gerothanassis, I.P.; Pérez-Sánchez, H.; Tzakos, A.G. ANTIAGE-DB: A Database and Server for the Prediction of Anti-Aging Compounds Targeting Elastase, Hyaluronidase, and Tyrosinase. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2268, doi:10.3390/antiox11112268.

## REFERENCES

73. Cefali, L.C.; Ataide, J.A.; Moriel, P.; Foglio, M.A.; Mazzola, P.G. Plant-based active photoprotectants for sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science* **2016**, *38*, 346–353, doi:10.1111/ics.12316.
74. Polefka, T.G.; Meyer, T.A.; Agin, P.P.; Bianchini, R.J. Effects of Solar Radiation on the Skin. *J of Cosmetic Dermatology* **2012**, *11*, 134–143, doi:10.1111/j.1473-2165.2012.00614.x.
75. Schneider, S.L.; Lim, H.W. Review of Environmental Effects of Oxybenzone and Other Sunscreen Active Ingredients. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2019**, *80*, 266–271, doi:10.1016/j.jaad.2018.06.033.
76. Narla, S.; Lim, H.W. Sunscreen: FDA Regulation, and Environmental and Health Impact. *Photochem Photobiol Sci* **2020**, *19*, 66–70, doi:10.1039/c9pp00366e.
77. Fivenson, D.; Sabzevari, N.; Qiblawi, S.; Blitz, J.; Norton, B.B.; Norton, S.A. Sunscreens: UV Filters to Protect Us: Part 2-Increasing Awareness of UV Filters and Their Potential Toxicities to Us and Our Environment. *International Journal of Women's Dermatology* **2021**, *7*, 45–69, doi:10.1016/j.ijwd.2020.08.008.
78. Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301–312, doi:10.1039/B918763B.
79. Zhou, F.; Hearne, Z.; Li, C.-J. Water—the Greenest Solvent Overall. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2019**, *18*, 118–123, doi:10.1016/j.cogsc.2019.05.004.
80. Cseri, L.; Razali, M.; Pogany, P.; Szekely, G. Organic Solvents in Sustainable Synthesis and Engineering. In *Green Chemistry: an inclusive approach*; Török, B., Dransfield, T., Eds.; Elsevier, 2018; pp. 513–553 ISBN 978-0-12-809270-5.
81. Winterton, N. The Green Solvent: A Critical Perspective. *Clean Techn Environ Policy* **2021**, *23*, 2499–2522, doi:10.1007/s10098-021-02188-8.
82. Prat, D.; Pardigon, O.; Flemming, H.-W.; Letestu, S.; Ducandas, V.; Isnard, P.; Guntrum, E.; Senac, T.; Ruisseau, S.; Cruciani, P.; et al. Sanofi's Solvent Selection Guide: A Step Toward More Sustainable Processes. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 1517–1525, doi:10.1021/op4002565.
83. Henderson, R.K.; Jiménez-González, C.; Constable, D.J.C.; Alston, S.R.; Inglis, G.G.A.; Fisher, G.; Sherwood, J.; Binks, S.P.; Curzons, A.D. Expanding GSK's Solvent Selection Guide – Embedding Sustainability into Solvent Selection Starting at Medicinal Chemistry. *Green Chem.* **2011**, *13*, 854, doi:10.1039/c0gc00918k.
84. Alfonsi, K.; Colberg, J.; Dunn, P.J.; Fevig, T.; Jennings, S.; Johnson, T.A.; Kleine, H.P.; Knight, C.; Nagy, M.A.; Perry, D.A.; et al. Green Chemistry Tools to Influence a Medicinal Chemistry and Research Chemistry Based Organisation. *Green Chem.* **2008**, *10*, 31–36, doi:10.1039/B711717E.
85. Prat, D.; Wells, A.; Hayler, J.; Sneddon, H.; McElroy, C.R.; Abou-Shehadeh, S.; Dunn, P.J. CHEM21 Selection Guide of Classical- and Less Classical-Solvents. *Green Chem.* **2016**, *18*, 288–296, doi:10.1039/C5GC01008J.
86. Bodiguel, J. Objectifs de développement durable Available online: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/fr/objectifs-de-developpement-durable/> (accessed on 23 June 2024).
87. Kirkham, M.B. Structure and Properties of Water. In *Principles of Soil and Plant Water Relations (second edition)*; Academic Press, 2014; pp. 27–40 ISBN 978-0-12-420022-7.
88. Tobiszewski, M.; Tsakovski, S.; Simeonov, V.; Namieśnik, J.; Pena-Pereira, F. A Solvent Selection Guide Based on Chemometrics and Multicriteria Decision Analysis. *Green Chem.* **2015**, *17*, 4773–4785, doi:10.1039/C5GC01615K.
89. Aguiar, J.B.; Martins, A.M.; Almeida, C.; Ribeiro, H.M.; Marto, J. Water Sustainability: A Waterless Life Cycle for Cosmetic Products. *Sustainable Production and Consumption* **2022**, *32*, 35–51, doi:10.1016/j.spc.2022.04.008.
90. Lim, H.Y.; Kwon, K.H. Sustainable Assessment of the Environmental Activities of Major Cosmetics and Personal Care Companies. *Sustainability* **2023**, *15*, 13286, doi:10.3390/su151813286.
91. Chemat, F.; Abert Vian, M.A.; Ravi, H.K.; Khadhraoui, B.; Hilali, S.; Perino, S.; Fabiano Tixier, A.-S. Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. *Molecules* **2019**, *24*, 3007, doi:10.3390/molecules24163007.
92. Smallwood, I.M. *Handbook of Organic Solvent Properties*; Elsevier, 1996; ISBN 978-0-08-052378-1.
93. Mariott, A.A.; Smith, E.R. Table of Dielectric Constants of Pure Liquids 1951.
94. Mao, H.; Qiu, Z.; Xie, B.; Wang, Z.; Shen, Z.; Hou, W. Development and Application of Ultra-High Temperature Drilling Fluids in Offshore Oilfield Around Bohai Sea Bay Basin, China.; OTC: Kuala Lumpur, Malaysia, March 22 2016.
95. Breynaert, E.; Houllberghs, M.; Radhakrishnan, S.; Grübel, G.; Taulelle, F.; Martens, J.A. Water as a Tuneable Solvent: A Perspective. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 2557–2569, doi:10.1039/C9CS00545E.
96. VCCLAB Available online: <https://vccclab.org> (accessed on 15 August 2024).
97. Tetko, I.V.; Gasteiger, J.; Todeschini, R.; Mauri, A.; Livingstone, D.; Ertl, P.; Palyulin, V.A.; Radchenko, E.V.; Zefirov, N.S.; Makarenko, A.S.; et al. Virtual Computational Chemistry Laboratory – Design and Description. *J Comput Aided Mol Des* **2005**, *19*, 453–463, doi:10.1007/s10822-005-8694-y.
98. Picot-Allain, C.; Mahomoodally, M.F.; Ak, G.; Zengin, G. Conventional versus Green Extraction Techniques — a Comparative Perspective. *Current Opinion in Food Science* **2021**, *40*, 144–156, doi:10.1016/j.cofs.2021.02.009.

## REFERENCES

99. Roohinejad, S.; Nikmaram, N.; Brahim, M.; Koubaa, M.; Khelfa, A.; Greiner, R. Potential of Novel Technologies for Aqueous Extraction of Plant Bioactives. In *Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development*; Dominguez González, H., Jesús González Muñoz, M., Eds.; Elsevier, 2017; pp. 399–419 ISBN 978-0-12-809380-1.
100. Kujala, T.; Loponen, J.; Pihlaja, K. Betalains and Phenolics in Red Beetroot (*Beta Vulgaris*) Peel Extracts: Extraction and Characterisation. *Zeitschrift für Naturforschung C* **2001**, *56*, 343–348, doi:10.1515/znc-2001-5-604.
101. Kushwaha, R.; Kumar, V.; Vyas, G.; Kaur, J. Optimization of Different Variable for Eco-Friendly Extraction of Betalains and Phytochemicals from Beetroot Pomace. *Waste Biomass Valor* **2018**, *9*, 1485–1494, doi:10.1007/s12649-017-9953-6.
102. Lee, C.-H.; Wettasinghe, M.; Bolling, B.W.; Ji, L.-L.; Parkin, K.L. Betalains, Phase II Enzyme-Inducing Components From Red Beetroot (*Beta Vulgaris* L.) Extracts. *Nutrition and Cancer* **2005**, *53*, 91–103, doi:10.1207/s15327914nc5301\_11.
103. Prakash Maran, J.; Manikandan, S. Response Surface Modeling and Optimization of Process Parameters for Aqueous Extraction of Pigments from Prickly Pear (*Opuntia Ficus-Indica*) Fruit. *Dyes and Pigments* **2012**, *95*, 465–472, doi:10.1016/j.dyepig.2012.06.007.
104. Swamy, G.J.; Sangamithra, A.; Chandrasekar, V. Response Surface Modeling and Process Optimization of Aqueous Extraction of Natural Pigments from *Beta Vulgaris* Using Box–Behnken Design of Experiments. *Dyes and Pigments* **2014**, *111*, 64–74, doi:10.1016/j.dyepig.2014.05.028.
105. Nhon, H.T.N.; Hang, N.T.T. Optimization of Extraction of Betalain from Red Beetroot (*Beta Vulgaris* Var. *Rubra* (L.) Moq). *1* **2020**, *20*, 93–93.
106. Lavanya, V.; S.P., T.; Uma, D.; Venkatachalam, L. Studies on Extraction of Betalain Pigments by Different Solvents and Assessing Antioxidant Activity of *Bougainvillea Spectabilis* and *Celosia Argentea* Flowers. *Madras Agricultural Journal* **2019**, *106*, 104–108, doi:10.29321/MAJ.2019.000230.
107. Castellar, M.; Obón, J.; Fernández-López, J. The Isolation and Properties of a Concentrated Red-purple Betacyanin Food Colourant from *Opuntia Stricta* Fruits. *J Sci Food Agric* **2006**, *86*, 122–128, doi:10.1002/jsfa.2285.
108. Kujala, T.; Vienola, M.; Klika, K.; Loponen, J.; Pihlaja, K. Betalain and Phenolic Compositions of Four Beetroot (*Beta Vulgaris*) Cultivars. *European Food Research and Technology* **2002**, *214*, 505–510, doi:10.1007/s00217-001-0478-6.
109. Howard, J.E.; Villamil, M.B.; Riggins, C.W. Amaranth as a Natural Food Colorant Source: Survey of Germplasm and Optimization of Extraction Methods for Betalain Pigments. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 932440, doi:10.3389/fpls.2022.932440.
110. Borjan, D.; Šeregelj, V.; Andrejč, D.C.; Pezo, L.; Šaponjac, V.T.; Knez, Ž.; Vulić, J.; Marevci, M.K. Green Techniques for Preparation of Red Beetroot Extracts with Enhanced Biological Potential. *Antioxidants* **2022**, *11*, 805, doi:10.3390/antiox11050805.
111. Nirmal, N.P.; Mereddy, R.; Maqsood, S. Recent Developments in Emerging Technologies for Beetroot Pigment Extraction and Its Food Applications. *Food Chemistry* **2021**, *356*, 129611, doi:10.1016/j.foodchem.2021.129611.
112. Fu, Y.; Shi, J.; Xie, S.-Y.; Zhang, T.-Y.; Soladoye, O.P.; Aluko, R.E. Red Beetroot Betalains: Perspectives on Extraction, Processing, and Potential Health Benefits. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 11595–11611, doi:10.1021/acs.jafc.0c04241.
113. Ongkowitzo, P.; Luna-Vital, D.A.; Gonzalez De Mejia, E. Extraction Techniques and Analysis of Anthocyanins from Food Sources by Mass Spectrometry: An Update. *Food Chemistry* **2018**, *250*, 113–126, doi:10.1016/j.foodchem.2018.01.055.
114. Monrad, J.K.; Suárez, M.; Motilva, M.J.; King, J.W.; Srinivas, K.; Howard, L.R. Extraction of Anthocyanins and Flavan-3-ols from Red Grape Pomace Continuously by Coupling Hot Water Extraction with a Modified Expeller. *Food Research International* **2014**, *65*, 77–87, doi:10.1016/j.foodres.2014.04.020.
115. Bechtold, T.; Mussak, R.; Mahmud-Ali, A.; Ganglberger, E.; Geissler, S. Extraction of Natural Dyes for Textile Dyeing from Coloured Plant Wastes Released from the Food and Beverage Industry. *J Sci Food Agric* **2006**, *86*, 233–242, doi:10.1002/jsfa.2360.
116. Cissé, M.; Bohuon, P.; Sambe, F.; Kane, C.; Sakho, M.; Dornier, M. Aqueous Extraction of Anthocyanins from *Hibiscus Sabdariffa*: Experimental Kinetics and Modeling. *Journal of Food Engineering* **2012**, *109*, 16–21, doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.10.012.
117. Ali, B.H.; Cahliková, L.; Opletal, L.; Karaca, T.; Manoj, P.; Ramkumar, A.; Al Suleimani, Y.M.; Al Za'abi, M.; Nemmar, A.; Chocholousova-Havlikova, L.; et al. Effect of Aqueous Extract and Anthocyanins of Calyces of *Hibiscus Sabdariffa* (Malvaceae) in Rats with Adenine-Induced Chronic Kidney Disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2017**, *69*, 1219–1229, doi:10.1111/jphp.12748.
118. Tsai, P.-J.; McIntosh, J.; Pearce, P.; Camden, B.; Jordan, B.R. Anthocyanin and Antioxidant Capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Extract. *Food Research International* **2002**, *35*, 351–356, doi:10.1016/S0963-9969(01)00129-6.
119. Ferarsa, S.; Zhang, W.; Moulai-Mostefa, N.; Ding, L.; Jaffrin, M.Y.; Grimi, N. Recovery of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds from Purple Eggplant Peels and Pulps Using Ultrasonic-Assisted Extraction. *Food and Bioprocess Processing* **2018**, *109*, 19–28, doi:10.1016/j.fbp.2018.02.006.

## REFERENCES

120. Ku, C.S.; Mun, S.P. Optimization of the Extraction of Anthocyanin from Bokbunja (*Rubus Coreanus* Miq.) Marc Produced during Traditional Wine Processing and Characterization of the Extracts. *Bioresource Technology* **2008**, *99*, 8325–8330, doi:10.1016/j.biortech.2008.03.013.
121. Lapornik, B.; Prošek, M.; Golc Wondra, A. Comparison of Extracts Prepared from Plant By-Products Using Different Solvents and Extraction Time. *Journal of Food Engineering* **2005**, *71*, 214–222, doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036.
122. Oancea, S.; Stoia, M.; Coman, D. Effects of Extraction Conditions on Bioactive Anthocyanin Content of *Vaccinium Corymbosum* in the Perspective of Food Applications. *Procedia Engineering* **2012**, *42*, 489–495, doi:10.1016/j.proeng.2012.07.440.
123. Chandrasekhar, J.; Madhusudhan, M.C.; Raghavarao, K.S.M.S. Extraction of Anthocyanins from Red Cabbage and Purification Using Adsorption. *Food and Bioproducts Processing* **2012**, *90*, 615–623, doi:10.1016/j.fbp.2012.07.004.
124. Backes, E.; Pereira, C.; Barros, L.; Prieto, M.A.; Genena, A.K.; Barreiro, M.F.; Ferreira, I.C.F.R. Recovery of Bioactive Anthocyanin Pigments from *Ficus Carica* L. Peel by Heat, Microwave, and Ultrasound Based Extraction Techniques. *Food Research International* **2018**, *113*, 197–209, doi:10.1016/j.foodres.2018.07.016.
125. Nirmal, N.P.; Rajput, M.S.; Prasad, R.G.S.V.; Ahmad, M. Brazilin from *Caesalpinia Sappan* Heartwood and Its Pharmacological Activities: A Review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2015**, *8*, 421–430, doi:10.1016/j.apjtm.2015.05.014.
126. Settharaksa, S.; Monton, C.; Charoenchai, L. Optimization of *Caesalpinia Sappan* L. Heartwood Extraction Procedure to Obtain the Highest Content of Brazilin and Greatest Antibacterial Activity. *Journal of Integrative Medicine* **2019**, *17*, 351–358, doi:10.1016/j.joim.2019.05.003.
127. Sánchez, A.M.; Carmona, M.; Prodanov, M.; Alonso, G.L. Effect of Centrifugal Ultrafiltration on the Composition of Aqueous Extracts of Saffron Spice (*Crocus Sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7293–7301, doi:10.1021/jf801105x.
128. Rahaiee, S.; Hashemi, M.; Moini, S.; Shojaosadati, S.A.; Razavi, S.H. Comparison of Phytochemical Constituents and Antioxidant Activities of Aqueous and Alcoholic Extracts of Saffron. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* **2015**, *7*, 521–529, doi:10.3920/QAS2013.0376.
129. Halataei, B.; Khosravi, M.; Arbabian, S.; Sahraei, H.; Golmanesh, L.; Zardooz, H.; Jalili, C.; Ghoshooni, H. Saffron (*Crocus Sativus*) Aqueous Extract and Its Constituent Crocin Reduces Stress-induced Anorexia in Mice. *Phytotherapy Research* **2011**, *25*, 1833–1838, doi:10.1002/ptr.3495.
130. Hosseinzadeh, H.; Shamsaie, F.; Mehri, S.; Mehri, S. Antioxidant Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Crocus Sativus* L. Stigma and Its Bioactive Constituents, Crocin and Safranal. *Antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of <i>Crocus sativus</i> L. stigma and its bioactive constituents, crocin and safranal* **2009**, *5*, 419–424.
131. Hosseinzadeh, H.; Noraei, N.B. Anxiolytic and Hypnotic Effect of *Crocus Sativus* Aqueous Extract and Its Constituents, Crocin and Safranal, in Mice. *Phytotherapy Research* **2009**, *23*, 768–774, doi:10.1002/ptr.2597.
132. Imenshahidi, M.; Hosseinzadeh, H.; Javadpour, Y. Hypotensive Effect of Aqueous Saffron Extract (*Crocus Sativus* L.) and Its Constituents, Safranal and Crocin, in Normotensive and Hypertensive Rats. *Phytotherapy Research* **2010**, *24*, 990–994, doi:10.1002/ptr.3044.
133. Christodoulou, E.; Grafakou, M.-E.; Skaltsa, E.; Kadoglou, N.; Kostomitsopoulos, N.; Valsami, G. Preparation, Chemical Characterization and Determination of Crocetin's Pharmacokinetics after Oral and Intravenous Administration of Saffron (*Crocus Sativus* L.) Aqueous Extract to C57/BL6J Mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2019**, *71*, 753–764, doi:10.1111/jphp.13055.
134. Sarfarazi, M.; Jafari, S.M.; Rajabzadeh, G. Extraction Optimization of Saffron Nutraceuticals Through Response Surface Methodology. *Food Anal. Methods* **2015**, *8*, 2273–2285, doi:10.1007/s12161-014-9995-3.
135. Yang, B.; Liu, X.; Gao, Y. Extraction Optimization of Bioactive Compounds (Crocine, Geniposide and Total Phenolic Compounds) from Gardenia (*Gardenia Jasminoides* Ellis) Fruits with Response Surface Methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2009**, *10*, 610–615, doi:10.1016/j.ifset.2009.03.003.
136. De Abreu, F.P.; Dornier, M.; Dionisio, A.P.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Dhuique-Mayer, C. Cashew Apple (*Anacardium Occidentale* L.) Extract from by-Product of Juice Processing: A Focus on Carotenoids. *Food Chemistry* **2013**, *138*, 25–31, doi:10.1016/j.foodchem.2012.10.028.
137. Khantamat, O.; Dukaew, N.; Karinchai, J.; Chewonarin, T.; Pitchakarn, P.; Temviriyankul, P. Safety and Bioactivity Assessment of Aqueous Extract of Thai Henna (*Lawsonia Inermis* Linn.) Leaf. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **2021**, *84*, 298–312, doi:10.1080/15287394.2020.1866129.
138. Kavépour, N.; Bayati, M.; Rahimi, M.; Aliahmadi, A.; Nejad Ebrahimi, S. Optimization of Aqueous Extraction of Henna Leaves (*Lawsonia Inermis* L.) and Evaluation of Biological Activity by HPLC-Based Profiling and Molecular Docking Techniques. *Chemical Engineering Research and Design* **2023**, *195*, 332–343, doi:10.1016/j.cherd.2023.06.003.
139. El Massoudi, S.; Zinedine, A.; Rocha, J.M.; Benidir, M.; Najjari, I.; El Ghadraoui, L.; Benjelloun, M.; Errachidi, F. Phenolic Composition and Wound Healing Potential Assessment of Moroccan Henna (*Lawsonia Inermis*) Aqueous Extracts. *Cosmetics* **2023**, *10*, 92, doi:10.3390/cosmetics10030092.

## REFERENCES

140. Bukhari, M.N.; Shahid-ul-Islam; Shabbir, M.; Rather, L.J.; Shahid, M.; Singh, U.; Khan, M.A.; Mohammad, F. Dyeing Studies and Fastness Properties of Brown Naphtoquinone Colorant Extracted from *Juglans Regia* L. on Natural Protein Fiber Using Different Metal Salt Mordants. *Text Cloth Sustain* **2017**, *3*, 3, doi:10.1186/s40689-016-0025-2.
141. Sharma, N.; Ghosh, P.; Sharma, U.K.; Sood, S.; Sinha, A.K.; Gulati, A. Microwave-Assisted Efficient Extraction and Stability of Juglone in Different Solvents from *Juglans Regia* : Quantification of Six Phenolic Constituents by Validated RP-HPLC and Evaluation of Antimicrobial Activity. *Analytical Letters* **2009**, *42*, 2592–2609, doi:10.1080/00032710903202055.
142. Matławska, I.; Bylka, W.; Widy-Tyszkiewicz, E.; Stanisław, B. Determination of the Juglone Content of *Juglans Regia* Leaves by GC/MS. *Natural Product Communications* **2015**, *10*, 1934578X1501000726, doi:10.1177/1934578X1501000726.
143. Wang, Y.; Huang, X.; Liang, Q.; Fan, R.; Qin, F.; Luo, J.; Li, Y.; Liu, W.; Mao, X.; Ji, H.; et al. Simultaneous Quantitation of Seven Anthraquinones in Aqueous Extract of Rhubarb and Analysis for Absorption in Cerebrospinal Fluid of Patients with Traumatic Brain Injury Using UPLC-PDA Method. *Journal of Medicinal Plants Research* **2011**, *5*, 2879–2885.
144. Sakulpanich, A.; Gritsanapan, W. Determination of Anthraquinone Contents in *Cassia Fistula* Leaves for Alternative Source of Laxative Drugs. *Planta Med* **2009**, *75*, s-0029-1234665, doi:10.1055/s-0029-1234665.
145. Farizadeh, K.; Montazer, M.; Yazdanshenas, M.E.; Rashidi, A.; Malek, R.M.A. Extraction, Identification and Sorption Studies of Dyes from Madder on Wool. *J of Applied Polymer Sci* **2009**, *113*, 3799–3808, doi:10.1002/app.30051.
146. Önal, A. Extraction of Dyestuff From Madder Plant (*Rubia Tinctorum* L.) and Dyeing of Wool, Feathered-Leather and Cotton. *Turkish Journal of Chemistry* **1996**, *20*, 204–213, doi:-.
147. Karadag, R.; Torgan, E.; Yurdun, T. Formation and HPLC Analysis of the Natural Lake Pigment Obtained from Madder (*Rubia Tinctorum* L.). *Reviews in Analytical Chemistry* **2010**, *29*, 1–12, doi:10.1515/REVAC.2010.29.1.1.
148. Sakulpanich, A.; Gritsanapan, W. Extraction Method for High Content of Anthraquinones from *Cassia Fistula* Pods. *J health res* **2008**, *22*, 167–172.
149. Jiao, Y.; Zuo, Y. Ultrasonic Extraction and HPLC Determination of Anthraquinones, Aloe-emodine, Emodine, Rheine, Chrysophanol and Physcione, in Roots of *Polygoni Multiflora*. *Phytochemical Analysis* **2009**, *20*, 272–278, doi:10.1002/pca.1124.
150. Kowalska, G.; Baj, T.; Kowalski, R.; Szymańska, J. Optimization of Glycerol–Water Extraction of Selected Bioactive Compounds from Peppermint and Common Nettle. *Antioxidants* **2021**, *10*, 817, doi:10.3390/antiox10050817.
151. De Azeredo, H.M.C.; Pereira, A.C.; De Souza, A.C.R.; Gouveia, S.T.; Mendes, K.C.B. Study on Efficiency of Betacyanin Extraction from Red Beetroots. *Int J of Food Sci Tech* **2009**, *44*, 2464–2469, doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02037.x.
152. Basavaraja, T.; Joshi, A.; Sethi, S.; Arora, B.; Tomar, B.S.; Varghese, E.; Yadav, A. Extraction Procedure of Betalains Pigments from Hardy Beetroot Matrix and Its Stabilization. *Food Processing Preservation* **2022**, *46*, doi:10.1111/jfpp.16844.
153. Lao, F.; Giusti, M.M. Extraction of Purple Corn (*Zea Mays* L.) Cob Pigments and Phenolic Compounds Using Food-Friendly Solvents. *Journal of Cereal Science* **2018**, *80*, 87–93, doi:10.1016/j.jcs.2018.01.001.
154. Prakash Maran, J.; Manikandan, S.; Mekala, V. Modeling and Optimization of Betalain Extraction from *Opuntia Ficus-Indica* Using Box–Behnken Design with Desirability Function. *Industrial Crops and Products* **2013**, *49*, 304–311, doi:10.1016/j.indcrop.2013.05.012.
155. Sanchez-Gonzalez, N.; Jaime-Fonseca, M.R.; San Martin-Martinez, E.; Zepeda, L.G. Extraction, Stability, and Separation of Betalains from *Opuntia Joconostle* Cv. Using Response Surface Methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11995–12004, doi:10.1021/jf401705h.
156. Ferreira, L.F.; Minuzzi, N.M.; Rodrigues, R.F.; Pauletto, R.; Rodrigues, E.; Emanuelli, T.; Bochi, V.C. Citric Acid Water-Based Solution for Blueberry Bagasse Anthocyanins Recovery: Optimization and Comparisons with Microwave-Assisted Extraction (MAE). *LWT* **2020**, *133*, 110064, doi:10.1016/j.lwt.2020.110064.
157. Lee, J.; Wrolstad, R.E. Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste. *Journal of Food Science* **2004**, *69*, 564–573, doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb13651.x.
158. De Aguiar Cipriano, P.; Ekici, L.; Barnes, R.C.; Gomes, C.; Talcott, S.T. Pre-Heating and Polyphenol Oxidase Inhibition Impact on Extraction of Purple Sweet Potato Anthocyanins. *Food Chemistry* **2015**, *180*, 227–234, doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.020.
159. Gartaula, C.; Karki, D.B. Optimization of Extraction of Anthocyanins from Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* Var. *Sabdariffa*) in Aqueous Medium. *J Food Sci Technol Nepal* **2013**, *6*, 69–72, doi:10.3126/jfstn.v6i0.8263.
160. Eichhorn, S.; Winterhalter, P. Anthocyanins from Pigmented Potato (*Solanum Tuberosum* L.) Varieties. *Food Research International* **2005**, *38*, 943–948, doi:10.1016/j.foodres.2005.03.011.
161. Ryu, D.; Koh, E. Application of Response Surface Methodology to Acidified Water Extraction of Black Soybeans for Improving Anthocyanin Content, Total Phenols Content and Antioxidant Activity. *Food Chemistry* **2018**, *261*, 260–266, doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.061.

## REFERENCES

162. Nabli, R.; Achour, S.; Jourdes, M.; Teissedre, P.-L.; Helal, A.N.; Ezzili, B. Anthocyanins Composition and Extraction from Grenache Noir (*Vitis Vinifera* L.) Vine Leaf Using an Experimental Design II- by Ethanol or Sulfur Dioxide in Acidified Water. *OENO One* **2013**, *47*, 301, doi:10.20870/oeno-one.2013.47.4.1561.
163. Cacace, J.E.; Mazza, G. Mass Transfer Process during Extraction of Phenolic Compounds from Milled Berries. *Journal of Food Engineering* **2003**, *59*, 379–389, doi:10.1016/S0260-8774(02)00497-1.
164. Cacace, J.E.; Mazza, G. Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5939–5946, doi:10.1021/jf025614x.
165. Gao, L.; Mazza, G. Extraction of Anthocyanin Pigments from Purple Sunflower Hulls. *Journal of Food Science* **1996**, *61*, 600–603, doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb13167.x.
166. Ju, Z.; Howard, L.R. Subcritical Water and Sulfured Water Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Dried Red Grape Skin. *Journal of Food Science* **2006**, *70*, S270–S276, doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb07202.x.
167. Gómez-Plaza, E.; Miñano, A.; López-Roca, J.M. Comparison of Chromatic Properties, Stability and Antioxidant Capacity of Anthocyanin-Based Aqueous Extracts from Grape Pomace Obtained from Different Vinification Methods. *Food Chemistry* **2006**, *97*, 87–94, doi:10.1016/j.foodchem.2005.03.025.
168. Zaheer, Z.; Danish, E.Y.; Kosa, S.A. 2-Hydroxy-1, 4-Napthoquinone Solubilization, Thermodynamics and Adsorption Kinetics with Surfactant. *Chinese Journal of Chemical Engineering* **2021**, *32*, 212–223, doi:10.1016/j.cjche.2020.09.064.
169. Derksen, G.C.H. Red, Redder, Madder: Analysis and Isolation of Anthraquinones from Madder Roots (*Rubia Tinctorum*). Thèse de doctorat, Wageningen Universiteit: Wageningen, 2001.
170. Malekzadeh, F.; Shabestari, P.P. Therapeutic Effects and In Vitro Activity of an Extract from *Lawsonia Inermis*. *J. Sci. I.R. Iran* **1989**, *1*, 7–12.
171. Lv, L.; Cui, Y.; Wang, X.; Wei, C.; Kuang, M. Study on extraction and dyeing behavior of madder pigment on wool fabric. *Journal of Textile & Clothing Technology* **2011**, *60*, 609.
172. Smith, J.; Wallin, H. *Annatto Extracts (Chemical and Technical Assessment)*; FAO, 2006; pp. 1–21;.
173. Handayani, I.; Haryanti, P.; Sulisty, S.B. Color and Antibacterial Activity of Annatto Extracts at Various pH of Distilled Water Solvent and Extraction Temperature. *Food Res.* **2021**, *5*, 247–253, doi:10.26656/fr.20175(6).740.
174. Bechtold, T.; Turcanu, A.; Geissler, S.; Ganglberger, E. Process Balance and Product Quality in the Production of Natural Indigo from *Polygonum Tinctorium* Ait. Applying Low-Technology Methods. *Bioresource Technology* **2002**, *81*, 171–177, doi:10.1016/S0960-8524(01)00146-8.
175. Stoker, K.G.; Cooke, D.T.; Hill, D.J. An Improved Method for the Large-Scale Processing of Woad (*Isatis Tinctoria*) for Possible Commercial Production of Woad Indigo. *Journal of Agricultural Engineering Research* **1998**, *71*, 315–320, doi:10.1006/jaer.1998.0329.
176. Frignani, E.; D'Eusano, V.; Grandi, M.; Pigani, L.; Roncaglia, F. A Continuous Extraction Protocol for the Characterisation of a Sustainably Produced Natural Indigo Pigment. *Life* **2023**, *14*, 59, doi:10.3390/life14010059.
177. Hartl, A.; Polleichtner, A.; Novak, J. “Purplish Blue” or “Greenish Grey”? Indigo Qualities and Extraction Yields from Six Species. *Plants* **2024**, *13*, 918, doi:10.3390/plants13070918.
178. Hidayati, L.; Ningrum, D.C.; Nugroho, H.; Nuringtyas, T.R. Optimization of Extraction Methods and Dyeing Standarization of Nila Leaves ( *Indigofera Tinctoria* Linn.) as Natural Dyes. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **2018**, *187*, 012031, doi:10.1088/1755-1315/187/1/012031.
179. Das, P.; Nayak, P.K.; Kesavan, R.K. Ultrasound Assisted Extraction of Food Colorants: Principle, Mechanism, Extraction Technique and Applications: A Review on Recent Progress. *Food Chemistry Advances* **2022**, *1*, 100144, doi:10.1016/j.focha.2022.100144.
180. Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.-G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Abert-Vian, M. Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review. *Ultrasonics Sonochemistry* **2017**, *34*, 540–560, doi:10.1016/j.ultsonch.2016.06.035.
181. More, P.R.; Jambrak, A.R.; Arya, S.S. Green, Environment-Friendly and Sustainable Techniques for Extraction of Food Bioactive Compounds and Waste Valorization. *Trends in Food Science & Technology* **2022**, *128*, 296–315, doi:10.1016/j.tifs.2022.08.016.
182. Tabio-García, D.; Paraguay-Delgado, F.; Sánchez-Madrugal, M.Á.; Quintero-Ramos, A.; Espinoza-Hicks, J.C.; Meléndez-Pizarro, C.O.; Ruiz-Gutiérrez, M.G.; Espitia-Rangel, E. Optimisation of the Ultrasound-Assisted Extraction of Betalains and Polyphenols from *Amaranthus Hypochondriacus* Var. Nutrisol. *Ultrasonics Sonochemistry* **2021**, *77*, 105680, doi:10.1016/j.ultsonch.2021.105680.
183. Ihtisham-Ul-Haq; Butt, M.S.; Randhawa, M.A.; Shahid, M. Extraction, Characterization and Optimization of Betalains from Red Beetroot Using Response Surface Methodology. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* **2020**, *57*, 535–543, doi:10.21162/PAKJAS/20.8337.
184. Amin, O.-H.; Rasmy, N.; Nabieh, N.; Ahmed, E. Phytochemical and Physicochemical Properties of Betalains Extracted from Red Beetroot (*Beta Vulgaris* L.). *Egypt. J. Chem.* **2023**, *67*, 283–295, doi:10.21608/ejchem.2023.232670.8527.

## REFERENCES

185. Fernando, G.S.N.; Wood, K.; Papaioannou, E.H.; Marshall, L.J.; Sergeeva, N.N.; Boesch, C. Application of an Ultrasound-Assisted Extraction Method to Recover Betalains and Polyphenols from Red Beetroot Waste. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2021**, *9*, 8736–8747, doi:10.1021/acssuschemeng.1c01203.
186. Melgar, B.; Dias, M.I.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R.; Rodriguez-Lopez, A.D.; Garcia-Castello, E.M. Ultrasound and Microwave Assisted Extraction of *Opuntia* Fruit Peels Biocompounds: Optimization and Comparison Using RSM-CCD. *Molecules* **2019**, *24*, 3618, doi:10.3390/molecules24193618.
187. Laqui-Vilca, C.; Aguilar-Tuesta, S.; Mamani-Navarro, W.; Montañó-Bustamante, J.; Condezo-Hoyos, L. Ultrasound-Assisted Optimal Extraction and Thermal Stability of Betalains from Colored Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd) Hulls. *Industrial Crops and Products* **2018**, *111*, 606–614, doi:10.1016/j.indcrop.2017.11.034.
188. Roriz, C.L.; Xavier, V.; Heleno, S.A.; Pinela, J.; Dias, M.I.; Calhella, R.C.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R.; Barros, L. Chemical and Bioactive Features of *Amaranthus Caudatus* L. Flowers and Optimized Ultrasound-Assisted Extraction of Betalains. *Foods* **2021**, *10*, 779, doi:10.3390/foods10040779.
189. Kuhn, F.; Silva De Azevedo, E.; Frazzon, J.; Zapata Noreña, C.P. Evaluation of Green Extraction Methods on Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity from *Bougainvillea Glabra* Bracts. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **2021**, *19*, 100362, doi:10.1016/j.scp.2020.100362.
190. Pérez-Loredo, M.G.; Jesús, L.H.D.; Barragán-Huerta, B.E. Extraction of Red Pitaya (*Stenocereus Stellatus*) Bioactive Compounds Applying Microwave, Ultrasound and Enzymatic Pretreatments. *Agrociencia* **2017**, *51*, 135–151.
191. Prakash Maran, J.; Priya, B.; Nivetha, C.V. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Pigments from *Bougainvillea Glabra* Flowers. *Industrial Crops and Products* **2015**, *63*, 182–189, doi:10.1016/j.indcrop.2014.09.059.
192. Righi Pessoa Da Silva, H.; Da Silva, C.; Bolanho, B.C. Ultrasonic-assisted Extraction of Betalains from Red Beet (*Beta Vulgaris* L.). *J Food Process Engineering* **2018**, *41*, e12833, doi:10.1111/jfpe.12833.
193. Medina-Meza, I.G.; Barbosa-Cánovas, G.V. Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Plum and Grape Peels by Ultrasonics and Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Engineering* **2015**, *166*, 268–275, doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.06.012.
194. Vidana Gamage, G.C.; Choo, W.S. Hot Water Extraction, Ultrasound, Microwave and Pectinase-Assisted Extraction of Anthocyanins from Blue Pea Flower. *Food Chemistry Advances* **2023**, *2*, 100209, doi:10.1016/j.focha.2023.100209.
195. Agcam, E.; Akyildiz, A.; Balasubramaniam, V.M. Optimization of Anthocyanins Extraction from Black Carrot Pomace with Thermosonication. *Food Chemistry* **2017**, *237*, 461–470, doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.098.
196. Varo, M.A.; Jacotet-Navarro, M.; Serratosa, M.P.; Mérida, J.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Bily, A.; Chemat, F. Green Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Phenolic Compounds Determined by High Performance Liquid Chromatography from Bilberry (*Vaccinium Myrtillus* L.) Juice By-Products. *Waste Biomass Valor* **2019**, *10*, 1945–1955, doi:10.1007/s12649-018-0207-z.
197. Santos, S.S.D.; Magalhães, F.D.S.; Paraíso, C.M.; Ogawa, C.Y.L.; Sato, F.; Santos Junior, O.D.O.; Visentainer, J.V.; Madrona, G.S.; Reis, M.H.M. Enhanced Conditions for Anthocyanin Extraction from Blackberry Pomace under Ultrasound Irradiation. *J Food Process Engineering* **2023**, *46*, e14077, doi:10.1111/jfpe.14077.
198. Kurniasari, L.; Kumoro, A.C.; Djaeni, M. Ultrasound Assisted Extraction of Sappan Wood (*Caesalpinia Sappan* L.) Using Different Solvents. *Food Res.* **2024**, *8*, 23–28, doi:10.26656/fr.2017.8(S1).4.
199. Septiani, I.E.; Kumoro, A.C.; Djaeni, M. The Effect of Solvent Volume Ratio and Extraction Time on the Yield of Red Dye from Sappanwood. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **2021**, *1053*, 012128, doi:10.1088/1757-899X/1053/1/012128.
200. Kha, T.C.; Nguyen, M.H.; Roach, P.D.; Stathopoulos, C.E. Ultrasound-Assisted Aqueous Extraction of Oil and Carotenoids from Microwave-Dried Gac (*Momordica Cochinchinensis* Spreng) Aril. *International Journal of Food Engineering* **2015**, *11*, 479–492, doi:10.1515/ijfe-2014-0220.
201. Karasu, S.; Bayram, Y.; Ozkan, K.; Sagdic, O. Extraction Optimization Crocin Pigments of Saffron (*Crocus Sativus*) Using Response Surface Methodology and Determination Stability of Crocin Microcapsules. *Food Measure* **2019**, *13*, 1515–1523, doi:10.1007/s11694-019-00067-x.
202. Nissar, J.; Masoodi, F.A.; Masoodi, L.; Ahad, T.; Furhan, J. Response Surface Methodology (RSM)-Based Statistical Modeling and Optimization of the Ultrasound-Assisted Extraction of Saffron Bioactives. *Biomass Conv. Bioref.* **2022**, doi:10.1007/s13399-022-03563-1.
203. Revelou, P.-K.; Kougianou, E.; Xagoraris, M.; Evangelaras, H.; Papadopoulos, G.K.; Kanakis, C.D.; Strati, I.F.; Pappas, C.S.; Tarantilis, P.A. Optimization of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Separation of Picrocrocin and Crocins from Saffron Extract. *Compounds* **2023**, *3*, 233–243, doi:10.3390/compounds3010019.
204. Destandau, E.; Michel, T. Microwave-Assisted Extraction. In *Natural product extraction: principles and applications*; Rostagno, M., Prado, J.M., Eds.; Green chemistry series; Royal Society of Chemistry, 2022 ISBN 978-1-83916-589-4.
205. Chambaud, M.; Colas, C.; Destandau, E. Water-Based Microwave-Assisted Extraction of Pigments from Madder Optimized by a Box–Behnken Design. *Separations* **2023**, *10*, 433, doi:10.3390/separations10080433.
206. Thirugnanasambandham, K.; Sivakumar, V. Microwave Assisted Extraction Process of Betalain from Dragon Fruit and Its Antioxidant Activities. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* **2017**, *16*, 41–48, doi:10.1016/j.jssas.2015.02.001.

## REFERENCES

207. Ferreres, F.; Grosso, C.; Gil-Izquierdo, A.; Valentão, P.; Mota, A.T.; Andrade, P.B. Optimization of the Recovery of High-Value Compounds from Pitaya Fruit by-Products Using Microwave-Assisted Extraction. *Food Chemistry* **2017**, *230*, 463–474, doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.061.
208. Slavov, A.; Karagyozev, V.; Denev, P.; Kratchanova, M.; Kratchanov, C. Antioxidant Activity of Red Beet Juices Obtained after Microwave and Thermal Pretreatments. *Czech J. Food Sci.* **2013**, *31*, 139–147, doi:10.17221/61/2012-CJFS.
209. Sharma, A.; Mazumdar, B.; Keshav, A. Valorization of Unsalable Amaranthus Tricolour Leaves by Microwave-Assisted Extraction of Betacyanin and Betaxanthin. *Biomass Conv. Bioref.* **2023**, *13*, 1251–1267, doi:10.1007/s13399-020-01267-y.
210. Sigwela, V.; De Wit, M.; Du Toit, A.; Osthoff, G.; Hugo, A. Bioactive Betalain Extracts from Cactus Pear Fruit Pulp, Beetroot Tubers, and Amaranth Leaves. *Molecules* **2021**, *26*, 5012, doi:10.3390/molecules26165012.
211. Zin, M.M.; Bánvölgyi, S. Emerging Technology Approach for Extractability and Stability of Betalains from the Peel of Beetroot (*Beta Vulgaris* L.). *Biomass Conv. Bioref.* **2023**, *13*, 10759–10769, doi:10.1007/s13399-021-01975-z.
212. Varadharajan, V.; Shanmugam, S.; Ramaswamy, A. Model Generation and Process Optimization of Microwave-assisted Aqueous Extraction of Anthocyanins from Grape Juice Waste. *J Food Process Engineering* **2017**, *40*, e12486, doi:10.1111/jfpe.12486.
213. Gigliobianco, M.R.; Cortese, M.; Peregrina, D.V.; Villa, C.; Lupidi, G.; Pruccoli, L.; Angeloni, C.; Tarozzi, A.; Censi, R.; Di Martino, P. Development of New Extracts of *Crocus Sativus* L. By-Product from Two Different Italian Regions as New Potential Active Ingredient in Cosmetic Formulations. *Cosmetics* **2021**, *8*, 51, doi:10.3390/cosmetics8020051.
214. Arvindekar, A.U.; Laddha, K.S. An Efficient Microwave-Assisted Extraction of Anthraquinones from *Rheum Emodi*: Optimisation Using RSM, UV and HPLC Analysis and Antioxidant Studies. *Industrial Crops and Products* **2016**, *83*, 587–595, doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.066.
215. Buyukakinci, B.Y.; Karadag, R. Optimization of the Natural Dyes Extraction (Madder and Wallonia Oak) and Cotton Dyeing Using Microwave Irradiation. *Text Leather Rev* **2022**, *5*, 451–462, doi:10.31881/TLR.2022.42.
216. Barrera Vázquez, M.F.; Andreatta, A.E.; Martini, R.E.; Núñez Montoya, S.C.; Cabrera, J.L.; Comini, L.R. Optimization of Pretreatment with Microwaves Prior the Pressurized Hot Water Extraction of Anthraquinones from *Heterophyllaea Pustulata*, Using Doehlert Experimental Design. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* **2020**, *155*, 108055, doi:10.1016/j.cep.2020.108055.
217. Zohourian, T.H.; Quitain, A.T.; Sasaki, M.; Goto, M. Polyphenolic Contents and Antioxidant Activities of *Lawsonia Inermis* Leaf Extracts Obtained by Microwave-Assisted Hydrothermal Method. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy* **2011**, *45*, 193–204, doi:10.1080/08327823.2011.11689814.
218. Sarfarazi, M.; Jafari, S.M.; Rajabzadeh, G.; Galanakis, C.M. Evaluation of Microwave-Assisted Extraction Technology for Separation of Bioactive Components of Saffron (*Crocus Sativus* L.). *Industrial Crops and Products* **2020**, *145*, 111978, doi:10.1016/j.indcrop.2019.111978.
219. Sudha, P.; Manoja, V.; Deepa, J.; Jayakumar, J.; Kishore, S.G.; Pandiselvam, R. Optimization of Microwave-Assisted Aqueous Extraction of Pigments from Annatto Seeds Using Box-Behnken Design. *Biomass Conv. Bioref.* **2023**, doi:10.1007/s13399-023-04046-7.
220. Syafaatullah, A.Q.; Mahfud, M. Optimization Extraction of *Indigofera Tinctoria* L. Using Microwave-Assisted Extraction. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **2021**, *1053*, 012131, doi:10.1088/1757-899X/1053/1/012131.
221. Zhang, J.; Wen, C.; Zhang, H.; Duan, Y.; Ma, H. Recent Advances in the Extraction of Bioactive Compounds with Subcritical Water: A Review. *Trends in Food Science & Technology* **2020**, *95*, 183–195, doi:10.1016/j.tifs.2019.11.018.
222. Luna-Vital, D.; Li, Q.; West, L.; West, M.; Gonzalez De Mejia, E. Anthocyanin Condensed Forms Do Not Affect Color or Chemical Stability of Purple Corn Pericarp Extracts Stored under Different pHs. *Food Chemistry* **2017**, *232*, 639–647, doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.169.
223. Garcia-Mendoza, M.D.P.; Espinosa-Pardo, F.A.; Baseggio, A.M.; Barbero, G.F.; Maróstica Junior, M.R.; Rostagno, M.A.; Martínez, J. Extraction of Phenolic Compounds and Anthocyanins from Juçara (*Euterpe Edulis* Mart.) Residues Using Pressurized Liquids and Supercritical Fluids. *The Journal of Supercritical Fluids* **2017**, *119*, 9–16, doi:10.1016/j.supflu.2016.08.014.
224. Poveda, J.M.; Loarce, L.; Alarcón, M.; Díaz-Maroto, M.C.; Alañón, M.E. Revalorization of Winery By-Products as Source of Natural Preservatives Obtained by Means of Green Extraction Techniques. *Industrial Crops and Products* **2018**, *112*, 617–625, doi:10.1016/j.indcrop.2017.12.063.
225. Pappas, V.M.; Athanasiadis, V.; Palaogiannis, D.; Pouliantiti, K.; Bozinou, E.; Lalas, S.I.; Makris, D.P. Pressurized Liquid Extraction of Polyphenols and Anthocyanins from Saffron Processing Waste with Aqueous Organic Acid Solutions: Comparison with Stirred-Tank and Ultrasound-Assisted Techniques. *Sustainability* **2021**, *13*, 12578, doi:10.3390/su132212578.
226. Pongnaravane, B.; Goto, M.; Sasaki, M.; Anekpankul, T.; Pavasant, P.; Shotipruk, A. Extraction of Anthraquinones from Roots of *Morinda Citrifolia* by Pressurized Hot Water: Antioxidant Activity of Extracts. **2006**, *7*.

## REFERENCES

227. Shotipruk, A.; Kiatsonserm, J.; Pavasant, P.; Goto, M.; Sasaki, M. Pressurized Hot Water Extraction of Anthraquinones from the Roots of *Morinda Citrifolia*. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1872–1875, doi:10.1021/bp049779x.
228. Barrera Vázquez, M.F.; Comini, L.R.; Milanesio, J.M.; Montoya, S.C.N.; Cabrera, J.L.; Bottini, S.; Martini, R.E. Pressurized Hot Water Extraction of Anthraquinones from *Heterophyllaea Pustulata* Hook f. (Rubiaceae). *The Journal of Supercritical Fluids* **2015**, *101*, 170–175, doi:10.1016/j.supflu.2015.02.029.
229. Muangrat, R.; Jirarattanarangsri, W.; Simapisan, P. Response Surface Methodology Applied to Subcritical Solvent Extraction of Brazilin Compound from *Caesalpinia Sappan* L. Heartwood. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2022**, *31*, 100408, doi:10.1016/j.jarmap.2022.100408.
230. Valizadeh Kiamahalleh, M.; Najafpour-Darzi, G.; Rahimnejad, M.; Moghadamnia, A.A.; Valizadeh Kiamahalleh, M. High Performance Curcumin Subcritical Water Extraction from Turmeric (*Curcuma Longa* L.). *Journal of Chromatography B* **2016**, *1022*, 191–198, doi:10.1016/j.jchromb.2016.04.021.
231. Mansor, M.A.M.; Nordin, M.F.M.; Kassim, A.S.M. Extraction of Zingiberaceae Family Rhizomes (*C. Longa*, *C. Xanthorrhiza* and *Z. Officinale*) Using Subcritical Water Extraction and Its Characterization Study. *Progress in Engineering Application and Technology* **2023**, *4*, 26–38.
232. Yulianto, M.E.; Paramita, V.; Hartati, I.; Amalia, R. Response Surface Methodology of Pressurized Liquid Water Extraction of Curcumin from *Curcuma Domestica* Val. *RJC* **2018**, *11*, 1564–1571, doi:10.31788/RJC.2018.1141990.
233. Yulianto, M.E.; Amalia, R.; Paramita, V.; Hartati, I.; Handayani, D.; Eliana, K.D. Investigation on Hydrothermal Extraction Rate on Curcumin from *Curcuma Domestica* Val. *adv sci lett* **2018**, *24*, 9698–9700, doi:10.1166/asl.2018.13117.
234. Yulianto, M.E.; Amalia, R.; Paramita, V.; Hartati, I.; Maulinda, N.A.; Shulthoni, M.A. The Effect of Operating Conditions on Curcumin Extracted from Turmeric by Hydrothermal Extraction. *E3S Web Conf.* **2019**, *125*, 19001, doi:10.1051/e3sconf/201912519001.
235. Euterpio, M.A.; Cavaliere, C.; Capriotti, A.L.; Crescenzi, C. Extending the Applicability of Pressurized Hot Water Extraction to Compounds Exhibiting Limited Water Solubility by pH Control: Curcumin from the Turmeric Rhizome. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *401*, 2977–2985, doi:10.1007/s00216-011-5383-7.
236. Perko, T.; Ravber, M.; Knez, Ž.; Škerget, M. Extraction of Curcuminoids from Turmeric (*Curcuma Longa* L.) with Subcritical Water. *Technologica Acta* **2016**, *9*, 29–32.
237. Mottahedin, P.; Haghighi Asl, A.; Khajenoori, M. Extraction of Curcumin and Essential Oil from *Curcuma Longa* L. by Subcritical Water via Response Surface Methodology: SWE of Curcumin and Essential Oil via RSM. *Journal of Food Processing and Preservation* **2017**, *41*, e13095, doi:10.1111/jfpp.13095.
238. Mohammadi, S.; Haghighi Asl, A.; Mottahedin, P. Experiments, Correlation, and Modeling of Curcumin Solubility in Subcritical Water (Water/Ethanol). *Chromatographia* **2020**, *83*, 1293–1305, doi:10.1007/s10337-020-03946-4.
239. Sarfarazi, M.; Jafari, S.M.; Rajabzadeh, G.; Feizi, J. Development of an Environmentally-Friendly Solvent-Free Extraction of Saffron Bioactives Using Subcritical Water. *LWT* **2019**, *114*, 108428, doi:10.1016/j.lwt.2019.108428.
240. Chemat, F.; Abert Vian, M.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Nutrizio, M.; Režek Jambrak, A.; Muneke, P.E.S.; Lorenzo, J.M.; Barba, F.J.; Binello, A.; Cravotto, G. A Review of Sustainable and Intensified Techniques for Extraction of Food and Natural Products. *Green Chem.* **2020**, *22*, 2325–2353, doi:10.1039/C9GC03878G.
241. Shinwari, K.J.; Rao, P.S. Thermal-Assisted High Hydrostatic Pressure Extraction of Nutraceuticals from Saffron (*Crocus Sativus*): Process Optimization and Cytotoxicity Evaluation against Cancer Cells. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2018**, *48*, 296–303, doi:10.1016/j.ifset.2018.07.003.
242. Loginova, K.V.; Lebovka, N.I.; Vorobiev, E. Pulsed Electric Field Assisted Aqueous Extraction of Colorants from Red Beet. *Journal of Food Engineering* **2011**, *106*, 127–133, doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.04.019.
243. Visockis, M.; Bobinaitė, R.; Ruzgys, P.; Barakauskas, J.; Markevičius, V.; Viškelis, P.; Šatkauskas, S. Assessment of Plant Tissue Disintegration Degree and Its Related Implications in the Pulsed Electric Field (PEF)–Assisted Aqueous Extraction of Betalains from the Fresh Red Beetroot. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2021**, *73*, 102761, doi:10.1016/j.ifset.2021.102761.
244. Nowacka, M.; Tappi, S.; Wiktor, A.; Rybak, K.; Miszczykowska, A.; Czyzewski, J.; Drozdal, K.; Witrowa-Rajchert, D.; Tylewicz, U. The Impact of Pulsed Electric Field on the Extraction of Bioactive Compounds from Beetroot. *Foods* **2019**, *8*, 244, doi:10.3390/foods8070244.
245. Puértolas, E.; Cregenzán, O.; Luengo, E.; Álvarez, I.; Raso, J. Pulsed-Electric-Field-Assisted Extraction of Anthocyanins from Purple-Fleshed Potato. *Food Chemistry* **2013**, *136*, 1330–1336, doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.080.
246. Pereira, R.N.; Rodrigues, R.M.; Genisheva, Z.; Oliveira, H.; De Freitas, V.; Teixeira, J.A.; Vicente, A.A. Effects of Ohmic Heating on Extraction of Food-Grade Phytochemicals from Colored Potato. *LWT* **2016**, *74*, 493–503, doi:10.1016/j.lwt.2016.07.074.
247. Pereira, R.N.; Coelho, M.I.; Genisheva, Z.; Fernandes, J.M.; Vicente, A.A.; Pintado, M.E.; Teixeira, E.J.A. Using Ohmic Heating Effect on Grape Skins as a Pretreatment for Anthocyanins Extraction. *Food and Bioprocess Technology* **2020**, *124*, 320–328, doi:10.1016/j.fbp.2020.09.009.

## REFERENCES

248. Cabas, B.M.; Icier, F. Ohmic Heating–Assisted Extraction of Natural Color Matters from Red Beetroot. *Food Bioprocess Technol* **2021**, *14*, 2062–2077, doi:10.1007/s11947-021-02698-9.
249. Ferreira-Santos, P.; Nobre, C.; Rodrigues, R.M.; Genisheva, Z.; Botelho, C.; Teixeira, J.A. Extraction of Phenolic Compounds from Grape Pomace Using Ohmic Heating: Chemical Composition, Bioactivity and Bioaccessibility. *Food Chemistry* **2024**, *436*, 137780, doi:10.1016/j.foodchem.2023.137780.
250. Rastogi, N.K. Impact of Gamma-Irradiation on Some Mass Transfer Driven Operations in Food Processing. *Radiation Physics and Chemistry* **2005**, *73*, 355–361, doi:10.1016/j.radphyschem.2004.11.004.
251. Nayak, C.A.; Chethana, S.; Rastogi, N.K.; Raghavarao, K.S.M.S. Enhanced Mass Transfer during Solid–Liquid Extraction of Gamma-Irradiated Red Beetroot. *Radiation Physics and Chemistry* **2006**, *75*, 173–178, doi:10.1016/j.radphyschem.2005.03.015.
252. Lianza, M.; Marincich, L.; Antognoni, F. The Greening of Anthocyanins: Eco-Friendly Techniques for Their Recovery from Agri-Food By-Products. *Antioxidants* **2022**, *11*, 2169, doi:10.3390/antiox11112169.
253. Makris, D.P.; Lalas, S. Glycerol and Glycerol-Based Deep Eutectic Mixtures as Emerging Green Solvents for Polyphenol Extraction: The Evidence So Far. *Molecules* **2020**, *25*, 5842, doi:10.3390/molecules25245842.
254. Fu, X.; Du, Y.; Zou, L.; Liu, X.; He, Y.; Xu, Y.; Li, L.; Luo, Z. Acidified Glycerol as a One-Step Efficient Green Extraction and Preservation Strategy for Anthocyanin from Blueberry Pomace: New Insights into Extraction and Stability Protection Mechanism with Molecular Dynamic Simulation. *Food Chemistry* **2022**, *390*, 133226, doi:10.1016/j.foodchem.2022.133226.
255. Kowalska, G.; Wyrostek, J.; Kowalski, R.; Pankiewicz, U. Evaluation of Glycerol Usage for the Extraction of Anthocyanins from Black Chokeberry and Elderberry Fruits. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2021**, *22*, 100296, doi:10.1016/j.jarmap.2021.100296.
256. Kaur, D.; Qadri, O.S. Green Extraction of Anthocyanins from *Syzygium Cumini* Fruit Pulp Using Aqueous Glycerol through Ultrasound-Assisted Extraction. *J. Umm Al-Qura Univ. Appl. Sci.* **2024**, doi:10.1007/s43994-024-00152-y.
257. Özkan, A.; Zannou, O.; Pashazadeh, H.; Koca, I. Application of Biosolvents for the Extraction of Anthocyanins from Gülfatma Flowers (*Alcea Apterocarpa* (Fenzl) Boiss): Optimization and Stability Approaches. *Biomass Conv. Bioref.* **2024**, *14*, 14933–14949, doi:10.1007/s13399-022-03730-4.
258. Eyiz, V.; Tontul, I.; Turker, S. Optimization of Green Extraction of Phytochemicals from Red Grape Pomace by Homogenizer Assisted Extraction. *Food Measure* **2020**, *14*, 39–47, doi:10.1007/s11694-019-00265-7.
259. Katsampa, P.; Valsamedou, E.; Grigorakis, S.; Makris, D.P. A Green Ultrasound-Assisted Extraction Process for the Recovery of Antioxidant Polyphenols and Pigments from Onion Solid Wastes Using Box–Behnken Experimental Design and Kinetics. *Industrial Crops and Products* **2015**, *77*, 535–543, doi:10.1016/j.indcrop.2015.09.039.
260. Trasanidou, D.; Apostolakis, A.; Makris, D.P. Development of a Green Process for the Preparation of Antioxidant and Pigment-Enriched Extracts from Winery Solid Wastes Using Response Surface Methodology and Kinetics. *Chemical Engineering Communications* **2016**, *203*, 1317–1325, doi:10.1080/00986445.2016.1189416.
261. Mourtzinis, I.; Prodromidis, P.; Grigorakis, S.; Makris, D.P.; Biliaderis, C.G.; Moschakis, T. Natural Food Colorants Derived from Onion Wastes: Application in a Yoghurt Product. *Electrophoresis* **2018**, *39*, 1975–1983, doi:10.1002/elps.201800073.
262. Mehta, D.; Kuksal, K.; Yadav, K.; Kumar Yadav, S.; Zhang, Y.; Hariram Nile, S. Ultrasound-Assisted Extraction and Encapsulation of Betalain from Prickly Pear: Process Optimization, in-Vitro Digestive Stability, and Development of Functional Gummies. *Ultrasonics Sonochemistry* **2024**, *108*, 106975, doi:10.1016/j.ultsonch.2024.106975.
263. Soares, B.P.; Ferreira, A.M.; Justi, M.; Rodrigues, L.G.G.; Oliveira, J.V.; Pinho, S.P.; Coutinho, J.A.P. Juçara Fruit (*Euterpe Edulis* Martius) Valorization Combining Emergent Extraction Technologies and Aqueous Solutions of Alkanediols. *Molecules* **2023**, *28*, 1607, doi:10.3390/molecules28041607.
264. Yara-Varón, E.; Li, Y.; Balcells, M.; Canela-Garayoa, R.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Chemat, F. Vegetable Oils as Alternative Solvents for Green Oleo-Extraction, Purification and Formulation of Food and Natural Products. *Molecules* **2017**, *22*, 1474, doi:10.3390/molecules22091474.
265. Roohinejad, S.; Oey, I.; Everett, D.W.; Niven, B.E. Evaluating the Effectiveness of  $\beta$ -Carotene Extraction from Pulsed Electric Field-Treated Carrot Pomace Using Oil-in-Water Microemulsion. *Food Bioprocess Technol* **2014**, *7*, 3336–3348, doi:10.1007/s11947-014-1334-6.
266. Van Chuyen, H.; Hoi, N.T.N.; Eun, J.-B. Improvement of Bixin Extraction Yield and Extraction Quality from Annatto Seed by Modification and Combination of Different Extraction Methods: Improved Extraction of Bixin from Annatto Seed. *International Journal of Food Science & Technology* **2012**, *47*, 1333–1338, doi:10.1111/j.1365-2621.2012.02977.x.
267. Tutunchi, P.; Roufegarinejad, L.; Hamishehkar, H.; Alizadeh, A. Extraction of Red Beet Extract with  $\beta$ -Cyclodextrin-Enhanced Ultrasound Assisted Extraction: A Strategy for Enhancing the Extraction Efficacy of Bioactive Compounds and Their Stability in Food Models. *Food Chemistry* **2019**, *297*, 124994, doi:10.1016/j.foodchem.2019.124994.
268. Bozinou, E.; Lakka, A.; Poulianiti, K.; Lalas, S.; Makris, D.P. Cyclodextrins as High-Performance Green Co-Solvents in the Aqueous Extraction of Polyphenols and Anthocyanin Pigments from Solid Onion Waste. *Eur Food Res Technol* **2021**, *247*, 2831–2845, doi:10.1007/s00217-021-03839-2.

## REFERENCES

269. Leite, A.C.; Ferreira, A.M.; Morais, E.S.; Khan, I.; Freire, M.G.; Coutinho, J.A.P. Cloud Point Extraction of Chlorophylls from Spinach Leaves Using Aqueous Solutions of Nonionic Surfactants. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6*, 590–599, doi:10.1021/acssuschemeng.7b02931.
270. Ferreira, A.M.; Leite, A.C.; Coutinho, J.A.P.; Freire, M.G. Chlorophylls Extraction from Spinach Leaves Using Aqueous Solutions of Surface-Active Ionic Liquids. *Sustainable Chemistry* **2021**, *2*, 764–777, doi:10.3390/suschem2040040.
271. Kiathevest, K.; Goto, M.; Sasaki, M.; Pavasant, P.; Shotipruk, A. Extraction and Concentration of Anthraquinones from Roots of *Morinda Citrifolia* by Non-Ionic Surfactant Solution. *Separation and Purification Technology* **2009**, *66*, 111–117, doi:10.1016/j.seppur.2008.11.017.
272. Shi, Z.; Zhu, X.; Cheng, Q.; Zhang, H. Micellar Extraction and Preconcentration of Anthraquinone Derivatives from Rhubarb Prior to Their HPLC-DAD Determination. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2007**, *30*, 255–271, doi:10.1080/10826070601064474.
273. Tan, Z.-J.; Li, F.-F.; Xing, J.-M. Cloud Point Extraction of Aloe Anthraquinones Based on Non-Ionic Surfactant Aqueous Two-Phase System. *Natural Product Research* **2012**, *26*, 1423–1432, doi:10.1080/14786419.2011.601415.
274. Feng, X.; Song, H.; Dong, B.; Yang, Y.; Yao, S. Sequential Extraction and Separation Using Ionic Liquids for Stilbene Glycoside and Anthraquinones in *Polygonum Multiflorum*. *Journal of Molecular Liquids* **2017**, *241*, 27–36, doi:10.1016/j.molliq.2017.06.012.
275. De Souza Mesquita, L.M.; Martins, M.; Maricato, É.; Nunes, C.; Quinteiro, P.S.G.N.; Dias, A.C.R.V.; Coutinho, J.A.P.; Pisani, L.P.; De Rosso, V.V.; Ventura, S.P.M. Ionic Liquid-Mediated Recovery of Carotenoids from the *Bactris Gasipaes* Fruit Waste and Their Application in Food-Packaging Chitosan Films. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2020**, *8*, 4085–4095, doi:10.1021/acssuschemeng.9b06424.
276. Gengatharan, A.; Dykes, G.; Choo, W.S. Betacyanins from *Hylocereus Polyrhizus*: Pectinase-Assisted Extraction and Application as a Natural Food Colourant in Ice Cream. *J Food Sci Technol* **2021**, *58*, 1401–1410, doi:10.1007/s13197-020-04651-8.
277. Lombardelli, C.; Benucci, I.; Mazzocchi, C.; Esti, M. A Novel Process for the Recovery of Betalains from Unsold Red Beets by Low-Temperature Enzyme-Assisted Extraction. *Foods* **2021**, *10*, 236, doi:10.3390/foods10020236.
278. Cabeza, M.S.; Merín, M.G.; Martín, M.C.; Sabaté, D.C.; Audisio, M.C.; Morata De Ambrosini, V.I. Effect of a Pectinase-Surfactin Preparation on Extraction of Pigments and Total Polyphenol from Malbec Grape Skins. *Am J Enol Vitic.* **2009**, *60*, 477–483, doi:10.5344/ajev.2009.60.4.477.
279. Teixeira, C.B.; Macedo, G.A.; Macedo, J.A.; Da Silva, L.H.M.; Rodrigues, A.M.D.C. Simultaneous Extraction of Oil and Antioxidant Compounds from Oil Palm Fruit (*Elaeis Guineensis*) by an Aqueous Enzymatic Process. *Bioresource Technology* **2013**, *129*, 575–581, doi:10.1016/j.biortech.2012.11.057.
280. Abd Rashid, S.N.A.; Ab. Malik, S.; Embi, K.; Mohd Ropi, N.A.; Yaakob, H.; Cheng, K.K.; Sarmidi, M.R.; Leong, H.Y. Carotenoids and Antioxidant Activity in Virgin Palm Oil (VPO) Produced from Palm Mesocarp with Low Heat Aqueous-Enzyme Extraction Techniques. *Materials Today: Proceedings* **2021**, *42*, 148–152, doi:10.1016/j.matpr.2020.10.616.
281. Noorshamsiana, A.W.; Astimar, A.A.; Iberahim, A.I.; Nor Faizah, J.; Anis, M.; Hamid, F.A.; Kamarudin, H. The Quality of Oil Extracted from Palm Pressed Fibre Using Aqueous Enzymatic Treatment. *JOPR* **2017**, *29*, 588–593, doi:10.21894/jopr.2017.0004.
282. Derksen, G.C.H.; Van Beek, T.A. *Rubia Tinctorum* L. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier, 2002; Vol. 26 G, pp. 629–684 ISBN 978-0-444-51004-4.
283. Wijnsma, R.; Verpoorte, R. Anthraquinones in the *Rubiaceae*. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G.W., Tamm, Ch., Eds.; Springer Vienna: Vienna, 1986; Vol. 49, pp. 79–149 ISBN 978-3-7091-8848-4.
284. Aggarwal, S. Indian Dye Yielding Plants: Efforts and Opportunities. *Nat Resour Forum* **2021**, *45*, 63–86, doi:10.1111/1477-8947.12214.
285. Dulo, B.; Phan, K.; Githaiga, J.; Raes, K.; De Meester, S. Natural Quinone Dyes: A Review on Structure, Extraction Techniques, Analysis and Application Potential. *Waste Biomass Valor* **2021**, *12*, 6339–6374, doi:10.1007/s12649-021-01443-9.
286. Singh, R.; Geetanjali; Chauhan, S.M.S. 9,10-Anthraquinones and Other Biologically Active Compounds from the Genus *Rubia*. *C&B* **2004**, *1*, 1241–1264, doi:10.1002/cbdv.200490088.
287. *Rubia tinctorum* L. Available online: <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-57890-synthese> (accessed on 5 August 2024).
288. Brandt, Wilhelm.; Brandt, W.; Gürke, M.; Köhler, F.E.; Pabst, G.; Schellenberg, G.; Vogtherr, M. *Köhler's Medizinal-Pflanzen in Naturgetreuen Abbildungen Mit Kurz Erläuterndem Texte: Atlas Zur Pharmacopoeia Germanica, Austriaca, Belgica, Danica, Helvetica, Hungarica, Rossica, Suecica, Neerlandica, British Pharmacopoeia, Zum Codex Medicamentarius, Sowie Zur Pharmacopoeia of the United States of America*; Fr. Eugen Köhler: Gera-Untermhaus, 1898; Vol. v.3;
289. Blackburn, R.S. Natural Dyes in Madder (*Rubia Spp.*) and Their Extraction and Analysis in Historical Textiles. *Coloration Technol* **2017**, *133*, 449–462, doi:10.1111/cote.12308.

## REFERENCES

290. Mouri, C.; Laursen, R. Identification of Anthraquinone Markers for Distinguishing *Rubia* Species in Madder-Dyed Textiles by HPLC. *Microchim Acta* **2012**, *179*, 105–113, doi:10.1007/s00604-012-0868-4.
291. Kawasaki, Y.; Goda, Y.; Yoshihira, K. The Mutagenic Constituents of *Rubia Tinctorum*. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1504–1509, doi:10.1248/cpb.40.1504.
292. Burnett, A.R.; Thomson, R.H. Naturally Occurring Quinones. Part XV. Biogenesis of the Anthraquinones in *Rubia Tinctorum* L. (Madder). *J. Chem. Soc., C* **1968**, 2437, doi:10.1039/j39680002437.
293. Eltamany, E.E.; Nafie, M.S.; Khodeer, D.M.; El-Tanahy, A.H.H.; Abdel-Kader, M.S.; Badr, J.M.; Abdelhameed, R.F.A. *Rubia Tinctorum* Root Extracts: Chemical Profile and Management of Type II Diabetes Mellitus. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 24159–24168, doi:10.1039/D0RA03442H.
294. Derksen, G.C.H.; Niederländer, H.A.G.; van Beek, T.A. Analysis of Anthraquinones in *Rubia Tinctorum* L. by Liquid Chromatography Coupled with Diode-Array UV and Mass Spectrometric Detection. *Journal of Chromatography A* **2002**, *978*, 119–127, doi:10.1016/S0021-9673(02)01412-7.
295. Derksen, G.C.H.; van Beek, T.A.; de Groot, A.E.; Capelle, A. High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Anthraquinone Glycosides and Aglycones in Madder Root (*Rubia Tinctorum* L.). *Journal of Chromatography A* **1998**, *816*, 277–281, doi:10.1016/S0021-9673(98)00492-0.
296. Cuoco, G.; Mathe, C.; Archier, P.; Chemat, F.; Vieillescazes, C. A Multivariate Study of the Performance of an Ultrasound-Assisted Madder Dyes Extraction and Characterization by Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection. *Ultrasonics Sonochemistry* **2009**, *16*, 75–82, doi:10.1016/j.ultsonch.2008.05.014.
297. Vaidyanathan, A. A New C-Glycosylanthraquinone from Madder Root. *Dyes and Pigments* **1985**, *6*, 27–30, doi:10.1016/0143-7208(85)80003-6.
298. Houari, F.Z.; Erenler, R.; Hariri, A. Biological Activities and Chemical Composition of *Rubia Tinctorum* (L) Root and Aerial Part Extracts Thereof. *Acta biol. Colomb.* **2022**, *27*, doi:10.15446/abc.v27n3.95476.
299. Borisov, M.I.; Lisovaya, L.I.; Pristupa, N.N. Flavonoids of *Rubia Tinctorum*. *Chem Nat Compd* **1970**, *6*, 370–370, doi:10.1007/BF00567329.
300. Boldizsár, I.; Szűcs, Z.; Füzfa, Zs.; Molnár-Perl, I. Identification and Quantification of the Constituents of Madder Root by Gas Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1133*, 259–274, doi:10.1016/j.chroma.2006.08.021.
301. El-Emary, N.A.; Backheet, E.Y. Three Hydroxymethylanthraquinone Glycosides from *Rubia Tinctorum*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 277–279, doi:10.1016/S0031-9422(97)01121-7.
302. Inouye, H.; Takeda, Y.; Nishimura, H.; Kanomi, A.; Okuda, T.; Puff, C. Chemotaxonomic Studies of Rubiaceae Plants Containing Iridoid Glycosides. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2591–2598, doi:10.1016/0031-9422(88)87030-4.
303. Sato, K.; Goda, Y.; Kawasaki, Y.; Okuyama, E.; Yoshihira, K.; Ozeki, Y.; Nakamura, M. Characteristic of Anthraquinone Production in Plant Roots and Cell Suspension Cultures of *Rubia Tinctorum* and *R. Akane*. *Plant tissue culture letters* **1992**, *9*, 220–226, doi:10.5511/plantbiotechnology1984.9.220.
304. Huq, A.; Stephens, P.W.; Ayed, N.; Binous, H.; Burgio, L.; Clark, R.J.H.; Pantos, E. Combined Technique Analysis of the Composition of Punic Make-up Materials. *Appl. Phys. A* **2006**, *83*, 253–256, doi:10.1007/s00339-006-3518-z.
305. Pérez-Arantegui, J.; Cepriá, G.; Ribechini, E.; Degano, I.; Colombini, M.P.; Paz-Peralta, J.; Ortiz-Palomar, E. Colorants and Oils in Roman Make-Ups—an Eye Witness Account. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2009**, *28*, 1019–1028, doi:10.1016/j.trac.2009.05.006.
306. Abou Elmaaty, T.; Sayed-Ahmed, K.; Elsis, H.; Magdi, M. Optimization of Extraction of Natural Antimicrobial Pigments Using Supercritical Fluids: A Review. *Processes* **2022**, *10*, 2111, doi:10.3390/pr10102111.
307. Imani, H.; Gharanjig, K.; Ahmadi, Z. A Novel Efficient Method for Eco-Friendly Deep Dyeing of Wool Yarns by Extracted Madder Dyes in the Presence of Additives. *Industrial Crops and Products* **2022**, *183*, 114970, doi:10.1016/j.indcrop.2022.114970.
308. Masawaki, T.; Taya, M.; Tone, S. Selective Solvent Extraction of Ruberythric Acid from Madder Roots and Subsequent Hydrolysis with  $\alpha$ -Glucosidase.
309. Derksen, G.C.H.; Lelyveld, G.P.; van Beek, T.A.; Capelle, A.; de Groot, A.E. Two Validated HPLC Methods for the Quantification of Alizarin and Other Anthraquinones in *Rubia Tinctorum* Cultivars. *Phytochemical Analysis* **2004**, *15*, 397–406, doi:10.1002/pca.800.
310. Derksen, G.C.H.; van Holthoon, F.L.; Willems, H.M.; Krul, C.A.M.; Franssen, M.C.R.; van Beek, T.A. Development of a Process for Obtaining Non-Mutagenic Madder Root (*Rubia Tinctorum*) Extract for Textile Dyeing. *Industrial Crops and Products* **2021**, *164*, 113344, doi:10.1016/j.indcrop.2021.113344.
311. Dabiri, M.; Salimi, S.; Ghassempour, A.; Rassouli, A.; Talebi, M. Optimization of Microwave-Assisted Extraction for Alizarin and Purpurin in *Rubiaceae* Plants and Its Comparison with Conventional Extraction Methods. *J. Sep. Science* **2005**, *28*, 387–396, doi:10.1002/jssc.200400041.
312. Cuoco, G.; Mathe, C.; Archier, P.; El Maâtaoui, M.; Vieillescazes, C. Cytological and Phytochemical Study of Madder Root Extracts Obtained by Ultrasonic and Classical Extractions. *Phytochemical Analysis* **2009**, *20*, 484–490, doi:10.1002/pca.1150.

## REFERENCES

313. Goodarzian, H.; Ekrami, E. Extraction of Dye from Madder Plant (*Rubia Tinctorum* L.) and Dyeing of Wool. *World Applied Sciences* **2010**, *9*, 434–436.
314. De Santis, D.; Moresi, M. Production of Alizarin Extracts from *Rubia Tinctorum* and Assessment of Their Dyeing Properties. *Industrial Crops and Products* **2007**, *26*, 151–162, doi:10.1016/j.indcrop.2007.02.002.
315. Anekpankul, T.; Goto, M.; Sasaki, M.; Pavasant, P.; Shotipruk, A. Extraction of Anti-Cancer Damnacanthol from Roots of *Morinda Citrifolia* by Subcritical Water. *Separation and Purification Technology* **2007**, *55*, 343–349, doi:10.1016/j.seppur.2007.01.004.
316. Jamaludin, R.; Kim, D.-S.; Salleh, L.M.; Lim, S.-B. Kinetic Study of Subcritical Water Extraction of Scopoletin, Alizarin, and Rutin from *Morinda Citrifolia*. *Foods* **2021**, *10*, 2260, doi:10.3390/foods10102260.
317. Zhang, G.; Chi, X. A Green Strategy for Obtaining Anthraquinones from *Rheum Tanguticum* by Subcritical Water. *Open Chemistry* **2020**, *18*, 702–710, doi:10.1515/chem-2020-0079.
318. Han, D.Q.; Zhao, J.; Xu, J.; Peng, H.S.; Chen, X.J.; Li, S.P. Quality Evaluation of *Polygonum Multiflorum* in China Based on HPLC Analysis of Hydrophilic Bioactive Compounds and Chemometrics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, *72*, 223–230, doi:10.1016/j.jpba.2012.08.026.
319. Ferreira, S.L.C.; Bruns, R.E.; Ferreira, H.S.; Matos, G.D.; David, J.M.; Brandão, G.C.; da Silva, E.G.P.; Portugal, L.A.; dos Reis, P.S.; Souza, A.S.; et al. Box-Behnken Design: An Alternative for the Optimization of Analytical Methods. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *597*, 179–186, doi:10.1016/j.aca.2007.07.011.
320. Hemwimon, S.; Pavasant, P.; Shotipruk, A. Microwave-Assisted Extraction of Antioxidative Anthraquinones from Roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and Purification Technology* **2007**, *54*, 44–50, doi:10.1016/j.seppur.2006.08.014.
321. Michel, T. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*), Université d'Orléans: Orléans, France, 2011.
322. Grigoras, C.G.; Destandau, E.; Fougère, L.; Elfakir, C. Evaluation of Apple Pomace Extracts as a Source of Bioactive Compounds. *Industrial Crops and Products* **2013**, *49*, 794–804, doi:10.1016/j.indcrop.2013.06.026.
323. Pérez, M.; Dominguez-López, I.; Lamuela-Raventós, R.M. The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)Phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71*, 17543–17553, doi:10.1021/acs.jafc.3c04022.
324. Rafaely, L.; Heron, S.; Nowik, W.; Tchaplá, A. Optimisation of ESI-MS Detection for the HPLC of Anthraquinone Dyes. *Dyes and Pigments* **2008**, *77*, 191–203, doi:10.1016/j.dyepig.2007.05.007.
325. Zhan, C.; Xiong, A.; Shen, D.; Yang, L.; Wang, Z. Characterization of the Principal Constituents of Danning Tablets, a Chinese Formula Consisting of Seven Herbs, by an UPLC-DAD-MS/MS Approach. *Molecules* **2016**, *21*, 631, doi:10.3390/molecules21050631.
326. Pearson, J.L.; Lee, S.; Suresh, H.; Low, M.; Nang, M.; Singh, S.; Lamin, F.; Kazzem, M.; Sullivan, S.; Khoo, C.S. The Liquid Chromatographic Determination of Chlorogenic and Caffeic Acids in Xu Duan (*Dipsacus Asperoides*) Raw Herb. *ISRN Analytical Chemistry* **2014**, *2014*, 1–6, doi:10.1155/2014/968314.
327. Fabre, N.; Rustan, I.; de Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J. Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 707–715, doi:10.1016/S1044-0305(01)00226-4.
328. Çalis, I.; Heilmann, J.; Tasdemir, D.; Linden, A.; Ireland, C.M.; Sticher, O. Flavonoid, Iridoid, and Lignan Glycosides from *Putoria c Alabrica*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 961–964, doi:10.1021/np000614h.
329. Lu, C.-M.; Yang, J.-J.; Wang, P.-Y.; Lin, C.-C. A New Acylated Flavonol Glycoside and Antioxidant Effects of *Hedyotis Diffusa*. *Planta Med* **2000**, *66*, 374–377, doi:10.1055/s-2000-8544.
330. Hirko, B.; Getu, A. *Bixa Orellana* (Annatto Bixa): A Review on Use, Structure, Extraction Methods and Analysis. *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management* **2022**, *5*, 687–696.
331. Raddatz-Mota, D.; Pérez-Flores, L.J.; Carrari, F.; Mendoza-Espinoza, J.A.; de León-Sánchez, F.D.; Pinzón-López, L.L.; Godoy-Hernández, G.; Rivera-Cabrera, F. Achiote (*Bixa Orellana* L.): A Natural Source of Pigment and Vitamin E. *J Food Sci Technol* **2017**, *54*, 1729–1741, doi:10.1007/s13197-017-2579-7.
332. Rivera-Madrid, R.; Aguilar-Espinosa, M.; Cárdenas-Conejo, Y.; Garza-Caligaris, L.E. Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa Orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fpls.2016.01406.
333. Ashraf, A.; Ijaz, M.U.; Muzammil, S.; Nazir, M.M.; Zafar, S.; Zihad, S.M.N.K.; Uddin, S.J.; Hasnain, M.S.; Nayak, A.K. The Role of Bixin as Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anticancer, and Skin Protecting Natural Product Extracted from *Bixa Orellana* L. *Fitoterapia* **2023**, *169*, 105612, doi:10.1016/j.fitote.2023.105612.
334. Pillai, S.; Soni, S.; Dhulap, S. Pharmacological and Cosmeceutical Applications of *Bixa Orellana* L.: A Review of the Scientific and Patent Literature. *Indian Journal of Natural Products and Resources* **2018**, *9*, 281–289, doi:10.56042/ijnpr.v9i4.12972.

## REFERENCES

335. Cardarelli, C.R.; Benassi, M. de T.; Mercadante, A.Z. Characterization of Different Annatto Extracts Based on Antioxidant and Colour Properties. *LWT - Food Science and Technology* **2008**, *41*, 1689–1693, doi:10.1016/j.lwt.2007.10.013.
336. Chisté, R.C.; Yamashita, F.; Gozzo, F.C.; Mercadante, A.Z. Simultaneous Extraction and Analysis by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Diode Array and Mass Spectrometric Detectors of Bixin and Phenolic Compounds from Annatto Seeds. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 57–63, doi:10.1016/j.chroma.2010.10.094.
337. Quintero Quiroz, J.; Naranjo Duran, A.M.; Silva Garcia, M.; Ciro Gomez, G.L.; Rojas Camargo, J.J. Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Annatto Seeds, Evaluation of Their Antimicrobial and Antioxidant Activity, and Identification of Main Compounds by LC/ESI-MS Analysis. *International Journal of Food Science* **2019**, *2019*, 1–9, doi:10.1155/2019/3721828.
338. De Oliveira Júnior, R.G.; Bonnet, A.; Braconnier, E.; Groult, H.; Prunier, G.; Beaugeard, L.; Grougnet, R.; Da Silva Almeida, J.R.G.; Ferraz, C.A.A.; Picot, L. Bixin, an Apocarotenoid Isolated from *Bixa Orellana* L., Sensitizes Human Melanoma Cells to Dacarbazine-Induced Apoptosis through ROS-Mediated Cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* **2019**, *125*, 549–561, doi:10.1016/j.fct.2019.02.013.
339. Guzmán, E.; Lucia, A. Essential Oils and Their Individual Components in Cosmetic Products. *Cosmetics* **2021**, *8*, 114, doi:10.3390/cosmetics8040114.
340. Kanjilal, P.B.; Singh, R.S. Agronomic Evaluation of Annatto (*Bixa Orellana* L.). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* **1996**, *3*, 13–17, doi:10.1300/J044v03n03\_03.
341. Zhou, L.; Zhang, J.; Xing, L.; Zhang, W. Applications and Effects of Ultrasound Assisted Emulsification in the Production of Food Emulsions: A Review. *Trends in Food Science & Technology* **2021**, *110*, 493–512, doi:10.1016/j.tifs.2021.02.008.
342. Vilar, D. de A.; Vilar, M.S. de A.; Moura, T.F.A. de L. e; Raffin, F.N.; Oliveira, M.R. de; Franco, C.F. de O.; de Athayde-Filho, P.F.; Diniz, M. de F.F.M.; Barbosa-Filho, J.M. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa Orellana* L.: A Review. *The Scientific World Journal* **2014**, *2014*, 1–11, doi:10.1155/2014/857292.
343. *Trees of New Guinea*; Utteridge, T.M.A., Jennings, L.V.S., Eds.; Kew publishing: Richmond, United Kingdom, 2021; ISBN 978-1-84246-750-3.
344. *Bixa orellana* L. Available online: <https://www.tela-botanica.org/bdtxa-nn-1321-synthese> (accessed on 13 August 2024).
345. Galindo-Cuspinera, V.; Lubran, M.B.; Rankin, S.A. Comparison of Volatile Compounds in Water- and Oil-Soluble Annatto (*Bixa Orellana* L.) Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2010–2015, doi:10.1021/jf011325h.
346. Shahid-ul-Islam; Rather, L.J.; Mohammad, F. Phytochemistry, Biological Activities and Potential of Annatto in Natural Colorant Production for Industrial Applications – A Review. *Journal of Advanced Research* **2016**, *7*, 499–514, doi:10.1016/j.jare.2015.11.002.
347. Dias, N.O.; Rebouças, T.N.; São José, A.R.; Amaral, C.L. Morpho-Agronomic Characterization and Estimates of Genetic Parameters in Annatto Plant. *Hortic. Bras.* **2017**, *35*, 242–246, doi:10.1590/s0102-053620170214.
348. Scotter, M.J. Characterisation of the Coloured Thermal Degradation Products of Bixin from Annatto and a Revised Mechanism for Their Formation. *Food Chemistry* **1995**, *53*, 177–185, doi:10.1016/0308-8146(95)90785-6.
349. Tirimanna, A.S.L. Study of the Carotenoid Pigments of *Bixa Orellana* L. Seeds by Thin Layer Chromatography. *Mikrochim Acta* **1981**, *76*, 11–16, doi:10.1007/BF01197299.
350. Jondiko, I.J.O.; Pattenden, G. Terpenoids and an Apocarotenoid from Seeds of *Bixa Orellana*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 3159–3162, doi:10.1016/0031-9422(89)80298-5.
351. Pino, J.A.; Correa, M.T. Chemical Composition of the Essential Oil from Annatto (*Bixa Orellana* L.) Seeds. *Journal of Essential Oil Research* **2003**, *15*, 66–67, doi:10.1080/10412905.2003.9712065.
352. Giorgi, A.; De Marinis, P.; Granelli, G.; Chiesa, L.M.; Panseri, S. Secondary Metabolite Profile, Antioxidant Capacity, and Mosquito Repellent Activity of *Bixa Orellana* from Brazilian Amazon Region. *Journal of Chemistry* **2013**, *2013*, 1–10, doi:10.1155/2013/409826.
353. Frega, N.; Mozzon, M.; Bocci, F. Identification and Estimation of Tocotrienols in the Annatto Lipid Fraction by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Amer Oil Chem Soc* **1998**, *75*, 1723–1727, doi:10.1007/s11746-998-0323-1.
354. Lim Bon Tong Preparation and the Chemistry of Natural Food Colours from Annatto Plant. *JTAFS* **1984**, *12*, 298–304.
355. Raddatz Mota, D.; Pérez Flores, L.J.; Carrari, F.O.; Insani, E.M.; Asis, R.; Mendoza Espinoza, J.A.; Díaz de León Sánchez, F.; Rivera Cabrera, F. Chemical Characterization and Quantification of the Pigment Extraction Yield of Seven Mexican Accessions of *Bixa Orellana*. **2016**.
356. Abayomi, M.; Adebayo, A.S.; Bennett, D.; Porter, R.; Campbell, J.S.- In Vitro Antioxidant Activity of *Bixa Orellana* (Annatto) Seed Extract. *J app pharm sci* **2014**, 101–106, doi:10.7324/JAPS.2014.40216.
357. Rodrigues, L.M.; Alcázar-Alay, S.C.; Petenate, A.J.; Meireles, M.A.A. Bixin Extraction from Defatted Annatto Seeds. *Comptes Rendus Chimie* **2014**, *17*, 268–283, doi:10.1016/j.crci.2013.10.010.

## REFERENCES

358. Sinha, K.; Chowdhury, S.; Saha, P.D.; Datta, S. Modeling of Microwave-Assisted Extraction of Natural Dye from Seeds of *Bixa Orellana* (Annatto) Using Response Surface Methodology (RSM) and Artificial Neural Network (ANN). *Industrial Crops and Products* **2013**, *41*, 165–171, doi:10.1016/j.indcrop.2012.04.004.
359. Taham, T.; Cabral, F.A.; Barrozo, M.A.S. Extraction of Bixin from Annatto Seeds Using Combined Technologies. *The Journal of Supercritical Fluids* **2015**, *100*, 175–183, doi:10.1016/j.supflu.2015.02.006.
360. Aluko, E. Ethanol-Based Extraction of Annatto (*Bixa Orellana* L.) and Characterization of the Bixin and Norbixin. *ACS Omega* **2024**, *9*, 18273–18277, doi:10.1021/acsomega.3c10120.
361. Aher, A.; Bairagi, S.; Kadaskar, P.; Desai, S.; Nimase, P. Formulation and Evaluation of Herbal Lipstick from Colour Pigments of *Bixa Orellana* (Bixaceae) Seeds. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2012**, *4*, 357–359.
362. Quintero Quiroz, J.Q.; Torres, A.C.; Ramirez, L.M.; Garcia, M.S.; Gomez, G.C.; Rojas, J. Optimization of the Microwave-Assisted Extraction Process of Bioactive Compounds from Annatto Seeds (*Bixa Orellana* L.). *Antioxidants* **2019**, *8*, 37, doi:10.3390/antiox8020037.
363. David, S.-L.J.; Julián, G.-C.C.; Liliana, V.-S.C.; Ayala-Aponte, A.A.; Liliana, S.-C. Kinetics and Bixine Extraction Time from Achiote (*Bixa Orellana* L.). *J Food Sci Technol* **2022**, *59*, 1239–1246, doi:10.1007/s13197-021-05209-y.
364. Balaswamy, K.; Prabhakara Rao, P.G.; Satyanarayana, A.; Rao, D.G. Stability of Bixin in Annatto Oleoresin and Dye Powder during Storage. *LWT - Food Science and Technology* **2006**, *39*, 952–956, doi:10.1016/j.lwt.2005.07.004.
365. Bachtler, S.; Bart, H.-J. Increase the Yield of Bioactive Compounds from Elder Bark and Annatto Seeds Using Ultrasound and Microwave Assisted Extraction Technologies. *Food and Bioprocess Processing* **2021**, *125*, 1–13, doi:10.1016/j.fbp.2020.10.009.
366. Yolmeh, M.; Habibi Najafi, M.B.; Farhoosh, R. Optimisation of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Pigment from Annatto Seeds by Response Surface Methodology (RSM). *Food Chemistry* **2014**, *155*, 319–324, doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.059.
367. Mercadante, A.Z.; Steck, A.; Rodriguez-Amaya, D.; Pfander, H.; Britton, G. Isolation of Methyl 9'-Z-Apo-6'-Lycopenoate from *Bixa Orellana*. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1201–1203, doi:10.1016/0031-9422(95)00784-9.
368. Mercadante, A.Z.; Steck, A.; Pfander, H. Isolation and Identification of New Apocarotenoids from Annatto (*Bixa Orellana*) Seeds. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1050–1054, doi:10.1021/jf960412k.
369. Mercadante, A.Z.; Steck, A.; Pfander, H. Three Minor Carotenoids from Annatto (*Bixa Orellana*) Seeds. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 135–139, doi:10.1016/S0031-9422(98)00761-4.
370. Mercadante, A.Z.; Steck, A.; Pfander, H. Isolation and Structure Elucidation of Minor Carotenoids from Annatto (*Bixa Orellana* L.) Seeds. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 1379–1383, doi:10.1016/S0031-9422(97)00462-7.
371. Vasu, S.; Palaniyappan, V.; Kothandam, H.P.; Badami, S. Microwave Facilitated Extraction of Bixin from *Bixa Orellana* and It's in-Vitro Antioxidant Activity. **2010**.
372. Jayakumar, J.; Sudha, P.; Rajkumar, P.; Pandiselvam, R.; Gurusamy, K.; Kumaran, K.; Subramanian, P. Comparative Study on the Effect of Solvents on Extraction of Bixin from Annatto Seed (*Bixa Orellana* L.) and Optimization of Process Parameters Using Box–Behnken Design. *Biomass Conv. Bioref.* **2024**, *14*, 19863–19874, doi:10.1007/s13399-023-04071-6.
373. Degnan, A.J.; Von Elbe, J.H.; Hartel, R.W. Extraction of Annatto Seed Pigment by Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Food Science* **1991**, *56*, 1655–1659, doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb08664.x.
374. Chao, R.R.; Mulvaney, S.J.; Sanson, D.R.; Hsieh, F.; Tempesta, M.S. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Annatto (*Bixa Orellana*) Pigments and Some Characteristics of the Color Extracts. *Journal of Food Science* **1991**, *56*, 80–83, doi:10.1111/j.1365-2621.1991.tb07980.x.
375. Silva, G.F.; Gamarra, F.M.C.; Oliveira, A.L.; Cabral, F.A. Extraction of Bixin from Annatto Seeds Using Supercritical Carbon Dioxide. *Braz. J. Chem. Eng.* **2008**, *25*, 419–426, doi:10.1590/S0104-66322008000200019.
376. Anderson, S.G.; Nair, M.G.; Chandra, A.; Morrison, E. Supercritical Fluid Carbon Dioxide Extraction of Annatto Seeds and Quantification Oftrans-Bixin by High Pressure Liquid Chromatography. *Phytochem. Anal.* **1997**, *8*, 247–249, doi:10.1002/(SICI)1099-1565(199709/10)8:5<247::AID-PCA361>3.0.CO;2-V.
377. Nobre, B.; Mach Queiroz, E.; Pessoa, F.; Coelho, J.; Palavra, A.; Mendes, R. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Bixin from Annatto Seeds. *Proceedings of the 6 th International Symposium on Supercritical Fluids (Tome 1)* **2003**, 117.
378. Vardanega, R.; Nogueira, G.C.; Nascimento, C.D.O.; Faria-Machado, A.F.; Meireles, M.A.A. Selective Extraction of Bioactive Compounds from Annatto Seeds by Sequential Supercritical CO<sub>2</sub> Process. *The Journal of Supercritical Fluids* **2019**, *150*, 122–127, doi:10.1016/j.supflu.2019.01.013.
379. Viñas-Ospino, A.; López-Malo, D.; Esteve, M.J.; Frígola, A.; Blesa, J. Green Solvents: Emerging Alternatives for Carotenoid Extraction from Fruit and Vegetable By-Products. *Foods* **2023**, *12*, 863, doi:10.3390/foods12040863.
380. Teramukai, K.; Kakui, S.; Beppu, F.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Effective Extraction of Carotenoids from Brown Seaweeds and Vegetable Leaves with Edible Oils. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2020**, *60*, 102302, doi:10.1016/j.ifset.2020.102302.

## REFERENCES

381. Pingret, D.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Chemat, F. Degradation during Application of Ultrasound in Food Processing: A Review. *Food Control* **2013**, *31*, 593–606, doi:10.1016/j.foodcont.2012.11.039.
382. Li, Y.; Fabiano-Tixier, A.S.; Ruiz, K.; Rossignol Castera, A.; Bauduin, P.; Diat, O.; Chemat, F. Comprehension of Direct Extraction of Hydrophilic Antioxidants Using Vegetable Oils by Polar Paradox Theory and Small Angle X-Ray Scattering Analysis. *Food Chemistry* **2015**, *173*, 873–880, doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.061.
383. Li, Y.; Fabiano-Tixier, A.S.; Ginies, C.; Chemat, F. Direct Green Extraction of Volatile Aroma Compounds Using Vegetable Oils as Solvents: Theoretical and Experimental Solubility Study. *LWT - Food Science and Technology* **2014**, *59*, 724–731, doi:10.1016/j.lwt.2014.05.064.
384. Busson-Breyse, J.; Farines, M.; Soulier, J. Jojoba Wax: Its Esters and Some of Its Minor Components. *J Americ Oil Chem Soc* **1994**, *71*, 999–1002, doi:10.1007/BF02542268.
385. Gad, H.A.; Roberts, A.; Hamzi, S.H.; Gad, H.A.; Touiss, I.; Altyar, A.E.; Kensara, O.A.; Ashour, M.L. Jojoba Oil: An Updated Comprehensive Review on Chemistry, Pharmaceutical Uses, and Toxicity. *Polymers* **2021**, *13*, 1711, doi:10.3390/polym13111711.
386. Deen, A.; Visvanathan, R.; Wickramarachchi, D.; Marikkar, N.; Nammi, S.; Jayawardana, B.C.; Liyanage, R. Chemical Composition and Health Benefits of Coconut Oil: An Overview. *J Sci Food Agric* **2021**, *101*, 2182–2193, doi:10.1002/jsfa.10870.
387. Kiritsakis, A.; Markakis, P. Olive Oil: A Review. In *Advances in Food Research*; Elsevier, 1988; Vol. 31, pp. 453–482 ISBN 978-0-12-016431-8.
388. Gros, Q.; Wolniaczyk, M.; Duval, J.; West, C.; Horie, S.; Toyota, Y.; Funada, Y.; Lesellier, E. Comparison of the Triglyceride Composition of Vegetable Samples with Ultra-High Efficiency / Low-Pressure Supercritical Fluid Chromatography – Mass Spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis* **2023**, *115*, 104960, doi:10.1016/j.jfca.2022.104960.
389. Lesellier, E.; Latos, A.; De Oliveira, A.L. Ultra High Efficiency/Low Pressure Supercritical Fluid Chromatography with Superficially Porous Particles for Triglyceride Separation. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1327*, 141–148, doi:10.1016/j.chroma.2013.12.046.
390. Duval, J.; Colas, C.; Pecher, V.; Poujol, M.; Tranchant, J.-F.; Lesellier, É. Contribution of Supercritical Fluid Chromatography Coupled to High Resolution Mass Spectrometry and UV Detections for the Analysis of a Complex Vegetable Oil – Application for Characterization of a Kniphofia Uvaria Extract. *Comptes Rendus. Chimie* **2016**, *19*, 1113–1123, doi:10.1016/j.crci.2015.11.022.
391. Andrikopoulos, N.K. Triglyceride Species Compositions of Common Edible Vegetable Oils and Methods Used for Their Identification and Quantification. *Food Reviews International* **2002**, *18*, 71–102, doi:10.1081/FRI-120003418.
392. FAO et OMS Norme Sur Les Huiles Végétales Portant Un Nom Spécifique - CXS 210-1999 2023.
393. FAO et OMS Norme Pour Les Huiles d'olive et Les Huiles de Grignons d'olive - CODEX STAN 33-1981 2015.
394. Interchimie Dossier Technique et Réglementaire : Huile de Jojoba Vierge 2019.
395. Interchimie Dossier Technique et Réglementaire : Huile de Coprah Raffinée 2021.
396. Interchimie Dossier Technique et Réglementaire : Huile de Tournesol Raffinée 2021.
397. El-Mahrab-Robert, M.; Rosilio, V.; Bolzinger, M.A.; Chaminade, P.; Grossiort, J.L. Assessment of Oil Polarity: Comparison of Evaluation Methods. *International journal of pharmaceutics* **2008**, *348*, 89–94, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.07.027.
398. Chutia, H.; Mahanta, C.L. Green Ultrasound and Microwave Extraction of Carotenoids from Passion Fruit Peel Using Vegetable Oils as a Solvent: Optimization, Comparison, Kinetics, and Thermodynamic Studies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2021**, *67*, 102547, doi:10.1016/j.ifset.2020.102547.
399. Nour, V.; Corbu, A.R.; Rotaru, P.; Karageorgou, I.; Lalas, S. Effect of Carotenoids, Extracted from Dry Tomato Waste, on the Stability and Characteristics of Various Vegetable Oils. *Grasas y Aceites* **2018**, *69*, 238, doi:10.3989/gya.0994171.
400. Corbu, A.R.; Rotaru, A.; Nour, V. Edible Vegetable Oils Enriched with Carotenoids Extracted from By-Products of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides Ssp. Sinensis*): The Investigation of Some Characteristic Properties, Oxidative Stability and the Effect on Thermal Behaviour. *J Therm Anal Calorim* **2020**, *142*, 735–747, doi:10.1007/s10973-019-08875-5.
401. Sabudak, T.; Ozturk, M.; Goren, A.C.; Kolak, U.; Topcu, G. Fatty Acids and Other Lipid Composition of Five *Trifolium* Species with Antioxidant Activity. *Pharmaceutical Biology* **2009**, *47*, 137–141, doi:10.1080/13880200802439343.
402. Ghazali, N.I.; Mohd Rais, R.Z.; Makpol, S.; Chin, K.Y.; Yap, W.N.; Goon, J.A. Effects of Tocotrienol on Aging Skin: A Systematic Review. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1006198, doi:10.3389/fphar.2022.1006198.
403. Singh, A.; Bajpai, V.; Kumar, S.; Sharma, K.R.; Kumar, B. Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in Different Plant Parts of *Terminalia Arjuna* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Natural Product Communications* **2016**, *11*, 1934578X1601100, doi:10.1177/1934578X1601100227.
404. Formato, M.; Piccolella, S.; Zidorn, C.; Pacifico, S. UHPLC-HRMS Analysis of *Fagus Sylvatica* (Fagaceae) Leaves: A Renewable Source of Antioxidant Polyphenols. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1140, doi:10.3390/antiox10071140.

## REFERENCES

405. Sánchez-Fernández, J.A.; Peña-Parás, L.; Vidaltamayo, R.; García-Acosta, G.E. Synthesis of Chromophores Based on Carbazole and Azobenzenes as Electron Donors and Acceptors with Nonlinear Optoelectrical and Optical Properties and Applications in Energy Storage Devices.
406. Kakkar, S.; Bais, S. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology* **2014**, *2014*, 1–9, doi:10.1155/2014/952943.
407. Youn, U.-J.; Lee, J.; Nam, J.-W.; Lee, Y.; Seo, E.-K. Identification of a New Isomer of Dihydrophaseic Acid 3'-O- $\beta$ -D-Glucopyranoside from *Nelumbo Nucifera*. *Bull Korean Chem Soc* **2011**, *32*, 4083–4085, doi:10.5012/bkcs.2011.32.11.4083.
408. Vishwakarma, K.; Upadhyay, N.; Kumar, N.; Yadav, G.; Singh, J.; Mishra, R.K.; Kumar, V.; Verma, R.; Upadhyay, R.G.; Pandey, M.; et al. Absciscic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Front. Plant Sci.* **2017**, *08*, doi:10.3389/fpls.2017.00161.
409. Guo, W.; Jiang, Y.; Chen, X.; Yu, P.; Wang, M.; Wu, X.; Zhang, D. Identification and Quantitation of Major Phenolic Compounds from *Penthorum Chinense* Pursh. by HPLC with Tandem Mass Spectrometry and HPLC with Diode Array Detection. *Journal of Separation Science* **2015**, *38*, 2789–2796, doi:10.1002/jssc.201500303.
410. He, Z.; Xia, W. Analysis of Phenolic Compounds in Chinese Olive (*Canarium Album* L.) Fruit by RPHPLC–DAD–ESI–MS. *Food Chemistry* **2007**, *105*, 1307–1311, doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.049.
411. Rodrigues, D.B.; Veríssimo, L.; Finimundy, T.; Rodrigues, J.; Oliveira, I.; Gonçalves, J.; Fernandes, I.P.; Barros, L.; Heleno, S.A.; Calheta, R.C. Chemical and Bioactive Screening of Green Polyphenol-Rich Extracts from Chestnut By-Products: An Approach to Guide the Sustainable Production of High-Added Value Ingredients. *Foods* **2023**, *12*, 2596, doi:10.3390/foods12132596.
412. Agrawal, O.D.; Kulkarni, Y.A. Mini-Review of Analytical Methods Used in Quantification of Ellagic Acid. *Reviews in Analytical Chemistry* **2020**, *39*, 31–44, doi:10.1515/revac-2020-0113.
413. Boulekbache-Makhlouf, L.; Meudec, E.; Chibane, M.; Mazauric, J.-P.; Slimani, S.; Henry, M.; Cheynier, V.; Madani, K. Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Diode Array Detection Mass Spectrometry of Phenolic Compounds in Fruit of *Eucalyptus Globulus* Cultivated in Algeria. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12615–12624, doi:10.1021/jf1029509.
414. Owczarek, A.; Różalski, M.; Krajewska, U.; Olszewska, M. Rare Ellagic Acid Sulphate Derivatives from the Rhizome of *Geum Rivale* L.—Structure, Cytotoxicity, and Validated HPLC–PDA Assay. *Applied Sciences* **2017**, *7*, 400, doi:10.3390/app7040400.
415. Harborne, J.B. Flavonoid Bisulphates and Their Co-Occurrences with Ellagic Acid in the Bixaceae, Frankeniaceae and Related Families. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1331–1337, doi:10.1016/S0031-9422(00)98620-5.
416. Meeting, J.F.E.C. on F.A.; Nations, F. and A.O. of the U. *Compendium of Food Additive Specifications: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives : 67th Meeting 2006*; Food & Agriculture Org., 2006; ISBN 978-92-5-105559-5.
417. Albuquerque, C.L.C.; Meireles, M.A.A. Defatting of Annatto Seeds Using Supercritical Carbon Dioxide as a Pretreatment for the Production of Bixin: Experimental, Modeling and Economic Evaluation of the Process. *The Journal of Supercritical Fluids* **2012**, *66*, 86–95, doi:10.1016/j.supflu.2012.01.004.
418. Van Den Dool, H.; Kratz, P.D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas–Liquid Partition Chromatography. *Journal of Chromatography A* **1963**, *11*, 463–471, doi:10.1016/S0021-9673(01)80947-X.
419. Shi, J.; Cao, C.; Xu, J.; Zhou, C. Research Advances on Biosynthesis, Regulation, and Biological Activities of Apocarotenoid Aroma in Horticultural Plants. *Journal of Chemistry* **2020**, *2020*, 1–11, doi:10.1155/2020/2526956.
420. Valarezo, E.; Torres-Torres, S.; Pineda-Guarnizo, N.; Jaramillo-Fierro, X.; Cartuche, L.; Morocho, V.; Meneses, M.A. Study of Essential Oil Isolated from Achiote (*Bixa Orellana*) Leaves: Chemical Composition, Enantiomeric Distribution and Antimicrobial, Antioxidant and Anticholinesterase Activities. *Antibiotics* **2023**, *12*, 710, doi:10.3390/antibiotics12040710.
421. Ortiz-Hidalgo, C.; Pina-Oviedo, S. Hematoxylin: Mesoamerica's Gift to Histopathology. Palo de Campeche (Logwood Tree), Pirates' Most Desired Treasure, and Irreplaceable Tissue Stain. *Int J Surg Pathol* **2019**, *27*, 4–14, doi:10.1177/1066896918787652.
422. Norton, S.A. The Useful Plants of Dermatology. II. Haematoxylum and Hematoxylin. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1996**, *34*, 149–151, doi:10.1016/S0190-9622(96)90867-1.
423. Escobar-Ramos, A.; Lobato-García, C.; Zamilpa, A.; Gómez-Rivera, A.; Tortoriello, J.; González-Cortazar, M. Homoisoflavonoids and Chalcones Isolated from *Haematoxylum Campechianum* L., with Spasmolytic Activity. *Molecules* **2017**, *22*, 1405, doi:10.3390/molecules22091405.
424. Bharadvaja, N.; Gautam, S.; Singh, H. Natural Polyphenols: A Promising Bioactive Compounds for Skin Care and Cosmetics. *Mol Biol Rep* **2023**, *50*, 1817–1828, doi:10.1007/s11033-022-08156-9.
425. Lalor, G.C.; Martin, S.L. Studies on Haematoxylin and Haematein, the Colouring Principles of Logwood: II—Behaviour in Aqueous Solutions at Varying pH, and the pK Values. *Journal of the Society of Dyers and Colourists* **1959**, *75*, 517–521, doi:10.1111/j.1478-4408.1959.tb02303.x.

## REFERENCES

426. Ngamwonglumlert, L.; Devahastin, S.; Chiewchan, N. Natural Colorants: Pigment Stability and Extraction Yield Enhancement via Utilization of Appropriate Pretreatment and Extraction Methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2017**, *57*, 3243–3259, doi:10.1080/10408398.2015.1109498.
427. Wang, J.; Zhao, Y.; Sun, B.; Yang, Y.; Wang, S.; Feng, Z.; Li, J. The Structure of Anthocyanins and the Copigmentation by Common Micromolecular Copigments: A Review. *Food Research International* **2024**, *176*, 113837, doi:10.1016/j.foodres.2023.113837.
428. Boudesocque-Delaye, L.; Ardeza, I.M.; Verger, A.; Grard, R.; Théry-Koné, I.; Perse, X.; Munnier, E. Natural Deep Eutectic Solvents as a Novel Bio-Based Matrix for Ready-to-Use Natural Antioxidants-Enriched Ingredients: Extraction and Formulation Optimization. *Cosmetics* **2024**, *11*, 17, doi:10.3390/cosmetics11010017.
429. Ling, J.K.U.; Hadinoto, K. Deep Eutectic Solvent as Green Solvent in Extraction of Biological Macromolecules: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 3381, doi:10.3390/ijms23063381.
430. *Haematoxylum Campechianum* L. Available online: <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000168536> (accessed on 18 August 2024).
431. Descourtilz, M.-É.; Descourtilz, J.T. *Flore pittoresque et médicale des Antilles, ou Histoire naturelle des plantes usuelles des colonies françaises, anglaises, espagnoles et portugaises*; Chez l'Éditeur, rue du 29 juillet, n° 10: A Paris, France, 1833;
432. Li-Gen, L.; Xie, H.; Wang, Y.-T.; Ding, J.; Ye, Y. Chemical Constituents from the Heartwood of *Haematoxylum Campechianum* as Protein Tyrosine Kinase Inhibitors. *Chem Biodivers* **2014**, *11*, 776–783, doi:10.1002/cbdv.201300183.
433. El-Sayed, N.H.; Michael, H.N.; Kandil, F.E.; Isha, M.S.; Mabry, T.J. Flavonoids and Other Phenolics of *Haematoxylum Campechianum*. *Biochemical Systematics and Ecology* **1994**, *22*, 763–764, doi:10.1016/0305-1978(94)90063-9.
434. Masuda, H.; Ohtani, K.; Mizutani, K.; Ogawa, S.; Kasai, R.; Tanaka, O. Chemical Study on *Haematoxylum Campechianum*: A Sweet Principle and New Dibenz[b, d]Oxocin Derivatives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1991**, *39*, 1382–1384, doi:10.1248/cpb.39.1382.
435. Kandil, F.E.; El-Sayed, N.H.; Micheal, H.N.; Ishak, M.S.; Mabry, T.J. Gallotannins and Flavonoids from *Haematoxylum Campechianum*. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1243–1245, doi:10.1016/0031-9422(95)00924-8.
436. Kandil, F. e; Michael, H.N.; Ishak, M.S.; Mabry, T.J. Phenolics and Flavonoids from *Haematoxylum Campechianum*. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 133–134, doi:10.1016/S0031-9422(98)00667-0.
437. Allison, R.T. Haematoxylin—from the Wood. *J Clin Pathol* **1999**, *52*, 527–528, doi:10.1136/jcp.52.7.527.
438. Lalor, G.C.; Martin, S.L. Studies on Haematoxylin and Haematein, the Colouring Principles of Logwood: I—Absorption Spectra of Pure Compounds in Various Solvents and a Spectrophotometric Method of Analysis for Haematoxylin and Haematein. *Journal of the Society of Dyers and Colourists* **1959**, *75*, 513–517, doi:10.1111/j.1478-4408.1959.tb02302.x.
439. Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E.M. *Plant Drug Analysis*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1984; ISBN 978-3-662-02400-3.
440. Bettinger, C.; Zimmermann, H.W. New Investigations on Hematoxylin, Hematein, and Hematein-Aluminium Complexes.
441. Tong, X.-Z.; Zhu, H.; Shi, Y.; Xu, H.-T.; Wang, B.; Zhao, J.-H. An LC/MS/MS Method for Simultaneous Quantitation of Two Homoisoflavones: Protosapannin B and Brazilin with Hypoglycemic Activity in Rat Plasma and Its Application to a Comparative Pharmacokinetic Study in Normal and Streptozotocin-Treated Rats. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, *148*, 682–690, doi:10.1016/j.jep.2013.05.029.
442. Shen, L.; Pang, S.; Zhong, M.; Sun, Y.; Qayum, A.; Liu, Y.; Rashid, A.; Xu, B.; Liang, Q.; Ma, H.; et al. A Comprehensive Review of Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) for Bioactive Components: Principles, Advantages, Equipment, and Combined Technologies. *Ultrasonics Sonochemistry* **2023**, *101*, 106646, doi:10.1016/j.ultsonch.2023.106646.
443. Kalinowska, M.; Gołębowska, E.; Świdorski, G.; Męczyńska-Wielgosz, S.; Lewandowska, H.; Pietryczuk, A.; Cudowski, A.; Astel, A.; Świśłocka, R.; Samsonowicz, M.; et al. Plant-Derived and Dietary Hydroxybenzoic Acids—A Comprehensive Study of Structural, Anti-/Pro-Oxidant, Lipophilic, Antimicrobial, and Cytotoxic Activity in MDA-MB-231 and MCF-7 Cell Lines. *Nutrients* **2021**, *13*, 3107, doi:10.3390/nu13093107.
444. Wianowska, D.; Olszowy-Tomczyk, M. A Concise Profile of Gallic Acid—From Its Natural Sources through Biological Properties and Chemical Methods of Determination. *Molecules* **2023**, *28*, 1186, doi:10.3390/molecules28031186.
445. Cai, R.; Yuan, Y.; Cui, L.; Wang, Z.; Yue, T. Cyclodextrin-Assisted Extraction of Phenolic Compounds: Current Research and Future Prospects. *Trends in Food Science & Technology* **2018**, *79*, 19–27, doi:10.1016/j.tifs.2018.06.015.
446. Yang, L.-J.; Chang, Q.; Zhou, S.-Y.; Yang, Y.-H.; Xia, F.-T.; Chen, W.; Li, M.; Yang, X.-D. Host–Guest Interaction between Brazilin and Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin: Preparation, Inclusion Mode, Molecular Modelling and Characterization. *Dyes and Pigments* **2018**, *150*, 193–201, doi:10.1016/j.dyepig.2017.12.010.
447. Bezerra, F.M.; Lis, M.J.; Firmino, H.B.; Dias Da Silva, J.G.; Curto Valle, R.D.C.S.; Borges Valle, J.A.; Scacchetti, F.A.P.; Tessaro, A.L. The Role of β-Cyclodextrin in the Textile Industry—Review. *Molecules* **2020**, *25*, 3624, doi:10.3390/molecules25163624.

## REFERENCES

448. Mura, P. Analytical Techniques for Characterization of Cyclodextrin Complexes in Aqueous Solution: A Review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, *101*, 238–250, doi:10.1016/j.jpba.2014.02.022.
449. Trüeb, R.M. Oxidative Stress and Its Impact on Skin, Scalp and Hair. *Intern J of Cosmetic Sci* **2021**, *43*, doi:10.1111/ics.12736.
450. Dario, M.F.; Baby, A.R.; Velasco, M.V.R. Effects of Solar Radiation on Hair and Photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2015**, *153*, 240–246, doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.09.025.
451. Bibi Sadeer, N.; Montesano, D.; Albrizio, S.; Zengin, G.; Mahomoodally, M.F. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths and Limitations. *Antioxidants* **2020**, *9*, 709, doi:10.3390/antiox9080709.
452. Essaidi, I.; Snoussi, A.; Ben Haj Koubaier, H.; Casabianca, H.; Bouzouita, N. Effect of Acid Hydrolysis on Alizarin Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rubia Tinctorum* Extracts. *PRT* **2017**, *46*, 379–384, doi:10.1108/PRT-11-2015-0116.
453. Kang, H.R.; Kim, H.J.; Suh, H.-J.; Kwon, O.O.; Kim, K.S.; Kim, J.-S. Reactive Oxygen Species Scavenging Activities of Naturally Occurring Colorants. *Food Sci Biotechnol* **2013**, *22*, 225–231, doi:10.1007/s10068-013-0031-y.
454. Dewanjee, S.; Gangopadhyay, M.; Bhattacharya, N.; Khanra, R.; Dua, T.K. Bioautography and Its Scope in the Field of Natural Product Chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2015**, *5*, 75–84, doi:10.1016/j.jpba.2014.06.002.
455. Ranasinghe, R.; Mathai, M.; Zulli, A. Revisiting the Therapeutic Potential of Tocotrienol. *BioFactors* **2022**, *48*, 813–856, doi:10.1002/biof.1873.
456. Törrönen, R. Sources and Health Effects of Dietary Ellagitannins. In *Chemistry and Biology of Ellagitannins*; WORLD SCIENTIFIC, 2009; pp. 298–319 ISBN 978-981-279-740-7.
457. Peyrot, C.; Mention, M.M.; Brunissen, F.; Allais, F. Sinapic Acid Esters: Octinoxate Substitutes Combining Suitable UV Protection and Antioxidant Activity. *Antioxidants* **2020**, *9*, 782, doi:10.3390/antiox9090782.
458. Beasley, D.G.; Meyer, T.A. Characterization of the UVA Protection Provided by Avobenzone, Zinc Oxide, and Titanium Dioxide in Broad-Spectrum Sunscreen Products: *American Journal of Clinical Dermatology* **2010**, *11*, 413–421, doi:10.2165/11537050-000000000-00000.
459. Iuliana, D.; Ovidiu George, I.; Elena-Cornelia, M.; Dana, S.; Elena, V.; Mariana, P.; Rodica, C. Multi-Functional Effects of Textiles Dyed with Madder Roots Powder (*Rubia Tinctoria*). *Industria Textila* **2019**, *69*, doi:10.35530/IT.069.06.1576.
460. Cai, X.; Li, H.; Zhang, L.; Yan, J. Dyeing Property Improvement of Madder with Polycarboxylic Acid for Cotton. *Polymers* **2021**, *13*, 3289, doi:10.3390/polym13193289.
461. Fernandez, M.; Alves, C.; Rodrigues, R.; Zille, A. Effect of Plasma and Cationization Pre-Treatments on Fastness and UV Protection of Cotton Dyed with Madder. In Proceedings of the ICONTEX 2022.
462. Alves, C.; Fernandes, M.; Rodrigues, R.; Zille, A. Dyeing of Cotton with Madder Using (Bio)Mordants: Effects on Fastness and UV Protection Properties. In Proceedings of the AUTEX 2022 Conference; Łódź University of Technology.
463. Garcia, S.D.V.; Alves, P.E.S.; Dias, L.D.S.; Santos, L.J.D.C.; Lustosa, S.M.C.; Viana, D.D.S.F.; Viana, V.G.F. Synthesis and Determination of the Sun Protection Factor of a Cosmetic Gel-Cream Based on Norbixin. In *Global Health Trends and Perspectives in Health Sciences*; Seven Editora, 2023.
464. Mansur, J.S.; Breder, M.N.R.; Mansur, M.C.A.; Azulay, R.D. Determinação Do Fator De Proteção Solar Por Espectrofotometria. *An Bras Dermatol* **1986**, *61*, 121–124.
465. Walters, C.; Keeney, A.; Wigal, C.T.; Johnston, C.R.; Cornelius, R.D. The Spectrophotometric Analysis and Modeling of Sunscreens. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 99, doi:10.1021/ed074p99.
466. Sayre, R.M.; Agin, P.P.; LeVee, G.J.; Marlowe, E. A Comparison of *in Vivo* and *in Vitro* Testing of Sunscreening Formulas. *Photochem & Photobiology* **1979**, *29*, 559–566, doi:10.1111/j.1751-1097.1979.tb07090.x.
467. Saraf, S.; Kaur, C. *In Vitro* Sun Protection Factor Determination of Herbal Oils Used in Cosmetics. *Phcog Res* **2010**, *2*, 22, doi:10.4103/0974-8490.60586.
468. Arianto, A.; Cella, G.; Bangun, H. Preparation and Evaluation of Sunscreen Nanoemulsions with Synergistic Efficacy on SPF by Combination of Soybean Oil, Avobenzone, and Octyl Methoxycinnamate. *Open Access Maced J Med Sci* **2019**, *7*, 2751–2756, doi:10.3889/oamjms.2019.745.
469. Wasilewski, T.; Hordyjewicz-Baran, Z.; Zarębska, M.; Stanek, N.; Zajączko-Turko, E.; Tomaka, M.; Bujak, T.; Nizioł-Łukaszewska, Z. Sustainable Green Processing of Grape Pomace Using Micellar Extraction for the Production of Value-Added Hygiene Cosmetics. *Molecules* **2022**, *27*, 2444, doi:10.3390/molecules27082444.
470. Li, S.; Mu, B.; Wang, X.; Wang, A. Recent Researches on Natural Pigments Stabilized by Clay Minerals: A Review. *Dyes and Pigments* **2021**, *190*, 109322, doi:10.1016/j.dyepig.2021.109322.
471. Pathare, P.B.; Opara, U.L.; Al-Said, F.A.-J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technol* **2013**, *6*, 36–60, doi:10.1007/s11947-012-0867-9.
472. Karma, I.G.M. Determination and Measurement of Color Dissimilarity. *IJEET* **2020**, *5*, 67, doi:10.24843/IJEET.2020.v05.i01.p13.

## REFERENCES

473. Xu, W.-J.; Zhai, J.-W.; Cui, Q.; Liu, J.-Z.; Luo, M.; Fu, Y.-J.; Zu, Y.-G. Ultra-Turrax Based Ultrasound-Assisted Extraction of Five Organic Acids from Honeysuckle (*Lonicera Japonica* Thunb.) and Optimization of Extraction Process. *Separation and Purification Technology* **2016**, *166*, 73–82, doi:10.1016/j.seppur.2016.04.003.
474. Fougère, L. Signature Moléculaire de Milieux Complexes : Stratégie de Couplage à La Spectrométrie de Masse et Interprétation Des Données. Thèse de doctorat, Orléans, 2019.
475. Lee, S.K.; Mbawambo, Z.H.; Chung, H.S.; Luyengi, L.; Gamez, E.J.C.; Mehta, R.G.; Kinghorn, A.D.; Pezzuto, J.M. Evaluation of the Antioxidant Potential of Natural Products. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* **1998**, *1*, 35–46.
476. Tagliazucchi, D.; Verzelloni, E.; Bertolini, D.; Conte, A. In Vitro Bio-Accessibility and Antioxidant Activity of Grape Polyphenols. *Food Chemistry* **2010**, *120*, 599–606, doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.030.



**Marine CHAMBAUD**

## **Développement de méthodes d'éco-extraction à l'eau et caractérisation phytochimique de plantes tinctoriales d'intérêt cosmétique**

Les colorants végétaux peuvent être utilisés en cosmétique pour leur couleur, mais aussi pour certaines activités biologiques (antioxydante, ou anti-UV par exemple). L'utilisation d'un solvant vert, non toxique et le développement de méthodes d'éco-extraction permettent de valoriser les colorants végétaux, ainsi que les autres molécules non colorées présentes dans les plantes tinctoriales dans des ingrédients cosmétiques plus respectueux de l'environnement et de la santé humaine. L'eau est considérée comme l'un des solvants les plus verts et elle est à la base de la plupart des formulations cosmétiques. Cependant, en raison de leur polarité ou de leur stabilité, certains colorants peuvent difficilement être extraits à l'eau par des méthodes d'extraction conventionnelles.

L'objectif de la thèse est le développement de méthodes d'éco-extraction permettant d'accéder à des colorants de polarité variée utilisant l'eau comme solvant d'extraction et la caractérisation phytochimique des extraits ainsi obtenus. Trois plantes ont été étudiées, la garance des teinturiers (*Rubia tinctorum* L.), riche en anthraquinones moyennement polaires, le roucou (*Bixa orellana* L.), dont la couleur provient de la bixine, un apocaroténoïde liposoluble et le campêche (*Haematoxylum campechianum* L.), dont le colorant, l'hématéine, est hydrosoluble, mais relativement instable en solution. Pour chaque colorant, le développement et l'optimisation de la méthode d'extraction sont présentés, ainsi que la caractérisation de la couleur, de la composition phytochimique et de l'activité de l'extrait optimal. Enfin, plusieurs voies de valorisation dans des formulations cosmétiques sont proposées.

Mots clés : éco-extraction, eau, colorant, plante tinctoriale, cosmétique, MAE, UAE, huile végétale, HRMS, activité antioxydante

## **Development of aqueous eco-extraction methods and phytochemical characterization of dye plants for a cosmetic valorization**

Plant dyes can be used in cosmetics for their colour, as well as some bioactivities (for example antioxidant or anti-UV). The use of a green solvent, non-toxic and the development of green extraction methods enable the valorisation of dyes, and other colourless metabolites from dye plants into more eco-responsible cosmetic ingredients. Water is considered one of the greenest solvents and is the base of many cosmetic formulations. However, because of their polarity or their stability, some plant dyes can be challenging to extract with water using conventional extraction methods.

The aim of this thesis is the development of eco-extraction methods to recover plant dyes with various polarities using water as extraction solvent, as well as the phytochemical characterisation of the extracts. Three dye plants were studied, dyer's madder (*Rubia tinctorum* L.), which contains anthraquinones, dyes with a medium polarity, achiote (*Bixa orellana* L.), whose color comes from bixin, an oil-soluble apocarotenoid and logwood (*Haematoxylum campechianum* L.), which contains a water-soluble, but unstable dye, hematein. For each dye plant, the development and optimisation of the extraction method were presented. The characterisation of the color, phytochemical composition and activity of each extract are also discussed. Finally, several valorisation routes in cosmetic formulation are proposed.

Keywords : green extraction, water, plant dyes, dye plants, cosmetics, MAE, UAE, vegetable oil, HRMS, antioxidant activity,



**Institut de Chimie Organique et Analytique**  
**Université d'Orléans - Pôle de chimie**  
Rue de Chartres, 45067 Orléans

