

PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DE STABILITE
DES BETACYANINES D'AMARANTHUS¹ SPINOSUS L.
(AMARANTHACEAE) ET DE BOERHAAVIA ERECTA L.
(NYCTAGYNACEAE)

HILOU ADAMA*[†] ; PIRO JEAN ; NACOULMA G. ODILE

Laboratoire de Biochimie et de Chimie Appliquées (LABIOCA), UFR/SVT,
Université de Ouagadougou 03 BP 7021 Ouagadougou 03 Burkina Faso

(Reçu le 10/04/2002 – Révisé le 25/01/2003 - Accepté le 05/09/2003)

Summary : Some physicochemical parameters efficacy for the stability of two local plants (*Amaranthus spinosus* et *Boerhaavia erecta*) betacyanins extracts are studied. In this purpose the two plants betacyanins extracts lyophilisat solutions (10³g/ml) are used for the evaluation of the pH, temperature, metal cation, antioxidants and sequestrants effects. It results that the two plants betacyanins extracts are destroyed at temperature over 80°C and they are more stable in moderated acid buffered solutions. Also EDTA, isoascorbic acid, citric acid and α -tocopherol improve these betacyanins stability.

Keywords : betacyanins, betalains, *Amaranthus spinosus*, *Boerhaavia erecta*, natural dye

I – INTRODUCTION

Les bétalaines sont des pigments retrouvés dans neuf familles de l'ordre des Caryophyllales où ils remplacent les anthocyanes pour la coloration de divers organes végétaux (fleurs, fruits, tiges, racines)⁽¹⁾.

¹ Dans les tableaux de résultats on désignera *Amaranthus spinosus* par A S et *Boerhaavia erecta* par B.E

* auteur à contacter pour toute correspondance. Email : adama_hilou@univ-ouaga.bf

Ces pigments sont constitués d'un mélange de bétacyanines (rouge ou violet) et de bétaxanthines (jaune, orange) dont les proportions respectives déterminent la coloration finale de l'organe végétal^[2] : violet, rouge, orangé ou jaune. *Amaranthus spinosus* (Amarantaceae) et *Boerhaavia erecta* (Nyctaginaceae), sont deux espèces répandues dans toutes les régions du Burkina Faso^[3]. Elles sont traditionnellement utilisées aussi bien comme plantes médicinales que comme sources de colorants alimentaires et cosmétiques^[3].

De plus en plus, les consommateurs s'intéressent à la nature des additifs alimentaires depuis que certains colorants synthétiques ont été reconnus toxiques pour la santé humaine^[4]. Cela a induit un intérêt croissant pour les colorants naturels. Ainsi les bétalaines sont apparues comme de potentiels colorants alimentaires alternatifs aux composés synthétiques comme l'Amaranthe qui est cancérigène.

Cependant la faible stabilité de ces colorants (une fois extraits) constitue un obstacle majeur pour leur usage à grande échelle. Afin de surmonter cet obstacle, nous avons essayé de déterminer les conditions physiques (pH, Température) de stabilité de ces colorants, puis expérimenté l'effet de divers additifs chimiques sur ces pigments. Dans les deux espèces étudiées, les bétalaines sont en majorité localisées dans les écorces des tiges qui deviennent rouges à maturité. Nous avons donc utilisé ces écorces pour l'extraction. Pour la présente étude nous nous sommes exclusivement intéressés aux bétacyanines qui sont les bétalaines majoritaires des deux espèces utilisées. Les spectres UV-visible des extraits aqueux nous ont au préalable permis de déterminer les longueurs d'onde d'absorption maximale pour les bétacyanines de chacune des deux espèces utilisées : 523 nm pour *Amaranthus spinosus* et 526 nm pour *Boerhaavia erecta*^[5].

II - PARTIE EXPERIMENTALE

2.1 - Traitement du matériel végétal

Les tiges matures (rouges) des deux espèces ont été récoltées dans l'aire de l'ancien jardin expérimental de l'IDR (Institut du Développement Rural) à l'Université de Ouagadougou au mois d'octobre 1996. Pour chacune des deux espèces, 100g d'écorces sont extraites par macération avec deux litres de mélange méthanol/eau (70/30). Les extraits obtenus sont filtrés, centrifugés et concentrés au rotavapor (Buchi R-124) à 50°C sous pression réduite. Les extraits concentrés sont lyophilisés avec un Lyophilisateur Christ alpha 1-6.

Des solutions (10^{-3} g/ml) sont préparées avec les lyophilisats obtenus.

Tous les solvants utilisés sont de qualité analytique SdS.

2.2 - Méthode d'analyse

Pour l'estimation de la stabilité des pigments dans diverses conditions expérimentales, on utilise la méthode de PASCH et VON ELBE⁶¹. Cette méthode est basée sur le fait que la dégradation des bétacyanines se fait selon une cinétique d'ordre un (1)⁶¹, avec une énergie d'activation (Ea) égale à 12,5 kcal/mol à 25°C. Dans l'étude des réactions du premier ordre on peut déterminer le temps de demi réaction ou temps de demi-vie (T/2), qui est le temps au bout duquel la moitié des molécules (de bétacyanines) initialement présentes dans un milieu réactionnel est dégradée .

Cela se traduit par les relations suivantes :

$$\frac{(DO)_t}{(DO)_{t_0}} = \frac{a_t}{a_0}$$

$(DO)_{t_0}$ = densité optique mesurée à l'instant de départ (t_0).

$(DO)_t$ = densité optique mesurée à l'instant (t).

a_0 = concentration en bétacyanine à l'instant de départ.

a_t = concentration en bétacyanine à l'instant (t).

En cinétique d'ordre un (1) on a aussi la relation suivante:

$$\ln(a_t/a_0) = -kt \quad (1)$$

k est la constante de vitesse de la réaction de dégradation.

A $T_{1/2}$, la moitié des bétacyanines est dégradée, on a alors

$$(a_t/a_0) = 0,5$$

Donc (d'après la relation 1) : $\ln(0,5) = -k T_{1/2} \Leftrightarrow T_{1/2} = \ln(0,5)/-k$

Ainsi la valeur du temps de demi-vie ($T_{1/2}$) peut être utilisée comme élément de comparaison de la stabilité relative des bétacyanines d'un échantillon donné par rapport à un témoin. Des prélèvements sont faits toutes les 15 minutes dans les milieux réactionnels en vue d'un dosage spectrophotométrique. Les résultats obtenus permettent de tracer une droite d'équation :

$\ln(DO_t / DO_0) = f(\text{temps})$. La pente de cette droite vaut -k.

Les densités optiques sont mesurées avec un spectrophotomètre SEQUOIA Turner Mobil 340.

L'analyse statistique des données est faite avec le logiciel Microsoft Excell 97. Pour tous les tests, la valeur indiquée correspond à la moyenne de trois essais.

2.3 - Mode opératoire

Pour l'étude de l'effet du pH on utilise des solutions tampons phosphate 0,1 M de pH variable pour préparer les solutions de bétacyanines. Dans les autres cas on utilise les tampons suivants: tampon phosphate 0,1 M ; pH 5,2 pour *Amaranthus spinosus* et pH 5,8 pour *Boerhaavia erecta*.

La température est maintenue constante à l'aide d'un bain-marie thermostaté Buchi water bath B-480.

Les additifs chimiques suivants sont utilisés à différentes concentrations: acides organiques (lactique, acétique); sels métalliques

(FeCl₃, CuSO₄) ; antioxydants (acide ascorbique, acide isoascorbique, α -tocophérol) et séquestrants (citrate de sodium, Na₂EDTA).

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité Recta Pur (RP) et proviennent de Prolabo.

III - RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les temps de demi-vie (T_{1/2}) sont exprimés en minute.

3.1 - Effet du pH à 25°C

les résultats obtenus (figure 1) montrent que les bétacyanines d'*Amaranthus spinosus* ont une stabilité optimum à pH 5,2 ; tandis que celles de *Boerhaavia erecta* ont leur stabilité optimum à pH 5,8.

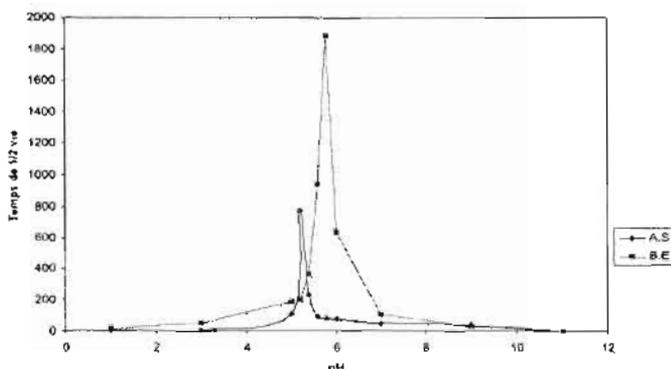
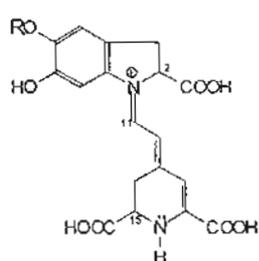


Figure 1 Effet du pH sur la stabilité des bétacyanines de A.S. et de B.E. à 25°C

Ainsi la stabilité de ces bétacyanines semble meilleure aux pH faiblement acides. La sensibilité des bétacyanines au pH pourrait s'expliquer par la structure de ces pigments (figure 2), notamment par

la présence de fonctions carboxyles et du groupe ammonium quaternaire.

Figure 2 : Structure de Bétacyanines (Bétanine et Amaranthine)¹¹



R = H Bétanidine (gémme chromophore)

R = β -D- Glucosyl : Bétanine

R = 2'-O-(β -D- acide Glucosyluronique) β -Dglucosyl :
Amaranthine

Toute modification sur l'un de ces deux types de fonctions par variation du pH peut affecter l'aromaticité de la molécule de bétacyanine. Selon Schliemann et al.¹⁷ qui ont observé un effet semblable sur les bétalaines de *Amaranthus caudatus*, l'effet dégradant du pH très acide serait dû à l'intensification du phénomène d'isomérisation (formation d'isomères en position C₁₅ et/ou C₂). Les bétalaines extraits des nos deux plantes sont acylées car leur spectre d'absorption UV-visible montre une importante absorption à 280 nm. Or, selon l'hypothèse précédente, les groupes acyles des bétalaines acylées, par l'encombrement stérique qu'ils engendrent sur les sites réactionnels d'isomérisation semblent empêcher celle-ci. En milieu très acide ces groupes acyles n'arrivent pas à jouer leur rôle, il y a alors isomérisation accélérée et attaque hydrolytique de la liaison aldimine (entre C₁₁ et N).

Cela entraîne l'hydrolyse de la bétacyanine en cyclodopa-5-o-glucoside et en acide Bétalamique¹⁸ (figure 4, ci-dessous). En milieu basique également, il y a hydrolyse par attaque de la liaison aldimine.

D'autre part la sensibilité au pH pourrait s'expliquer par la modification du potentiel redox ($E = E^0 - 0.6pH$), car des recherches menées par Attoe et al.^[9] ont montré que la dégradation oxydative des bétacyanines de *Béta vulgaris* en solution est en relation linéaire avec le potentiel redox du milieu).

3.2 - Effet de la Température sur la stabilité des bétacyanines de A.S et de B.E

Il ressort des résultats obtenus que les solutions congelées ne se dégradent pratiquement pas tandis qu'à partir de 75°C la dégradation devient très importante comme l'indique la figure 3.

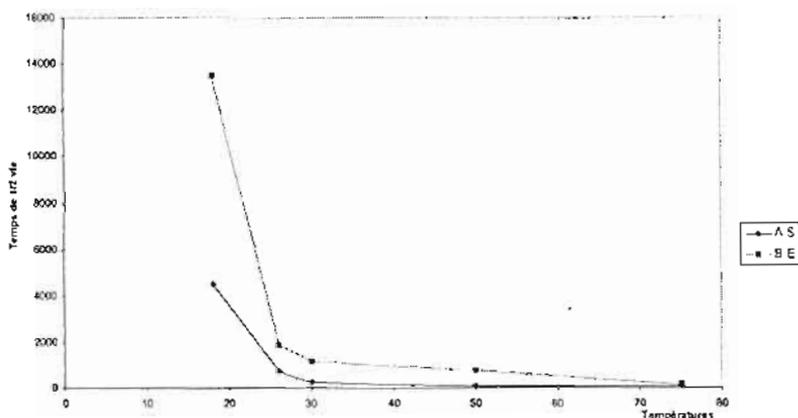


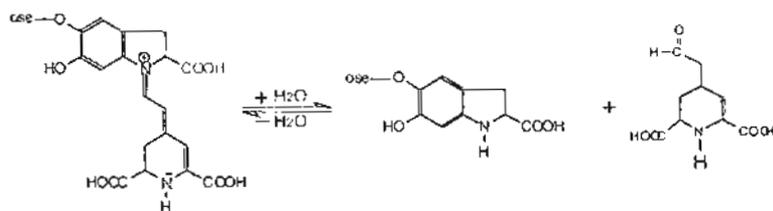
Figure.3 :Effet de la température sur la stabilité des bétacyanines de A.S et de B.E

Cela pourrait s'expliquer par la faiblesse de l'énergie d'activation de la réaction de dégradation des bétacyanines (12,5 kcal/mol à

25°C)^[6]. Von Elbe et al.^[10], qui ont obtenu des résultats similaires sur les bétalaines de *Beta vulgaris* stipulent que lors de la dégradation thermique, la première étape consiste en une attaque nucléophile par H₂O sur le carbone C₁₁, conduisant ainsi par hydrolyse de la liaison aldimine au cyclodopa-5-O-glucoside et à l'acide bétalamique (figure 4). Il serait possible que l'acide bétalamique et le cyclodopa-5-O-glucoside puissent, par une réaction de condensation d'une Base de Schiff, redonner la bétacyanine^[11], surtout à basse température. Cependant l'acide bétalamique qui est un composé très thermosensible peut également subir une condensation aldolique ou participer aux réactions de Maillard, ce qui le rend indisponible pour une réaction de régénération.

De même le cyclodopa-5-O-glucoside peut être hydrolysé. Il peut aussi s'oxyder, conduisant ainsi par polymérisation, aux composés de type mélaniques^[10].

FIGURE 4 : réaction de dégradation de la Bétanine par hydrolyse^[10].



3.3 - Effets d'additifs chimiques sur la stabilité des bétacyanines de AS et de BE

Diverses recherches ont montré que les deux espèces végétales sont riches en acides organiques (acides citrique, tartrique, ascorbique...) ^[3,6] et en sels minéraux. La grande stabilité *in vivo* de ces pigments pourrait s'expliquer par l'activité de certains de ces composés. C'est la raison

pour laquelle nous avons testé l'effet de certains composés chimiques sur la stabilité des bétacyanines des deux espèces organiques.

3.3.1- effets des acides sur la stabilité des bétacyanines de AS et de BE

Nous nous sommes intéressés ici aux acides lactique et acétique susceptibles de se retrouver dans divers aliments (lait, jus de fruit...). Les résultats obtenus (Tableau I) montrent que l'acide lactique a peu d'effet sur la stabilité des bétacyanines tandis que l'acide acétique est plutôt dégradant.

TABLEAU I : effet des acides organiques sur la stabilité sur la stabilité des bétacyanines de AS et de BE à 25°C

	Témoin	Acide acétique 100 ppm	Acide lactique 100 ppm
T1/2 (A.S)	680	608,28	658,103
T1/2 (B.E)	1698	1610,31	1690

L'effet dégradant de l'acide acétique pourrait s'expliquer par son caractère corrosif qui, par l'hydrolyse de la liaison glycosidique, fragilise ainsi la génine qui devient facilement hydrolysable.

De manière générale les acides (organiques ou minéraux) ne semblent pas pouvoir améliorer la stabilité des bétacyanines extraits, probablement à cause de l'effet d'abaissement du pH qu'ils induisent. Or en milieu très acide l'isomérisation est accentuée, ce qui fragilise la molécule^[7].

3.3.2 - Effets de cations métalliques sur la stabilité des bétacyanines de AS et de BE

Le test de stabilité avec les cations de fer et de cuivre s'explique par le fait que ces métaux peuvent se retrouver naturellement ou par

contamination dans divers aliments. Les résultats obtenus (Tableau II) montrent que ces cations entraînent une dégradation importante des bétacyanines.

TABLEAU II : *Effet de cations sur la stabilité des bétacyanines de A.S et de B.E à 25°C*

	Témoin	Fe ⁺³ (200ppm	Cu ²⁺
T 1/2 (A.S)	628	440,98	78,87
T1/2 (B.E)	1622	1093,6	203

Cette dégradation s'explique par le fait que ces deux cations (Fe⁺³, Cu²⁺) peuvent agir comme accepteur d'électrons. Cela pourrait déstabiliser le centre électrophile (l'ammonium quaternaire). Il en résulterait alors une hydrolyse plus facile de la liaison aldimine^[6].

3.3.2 - *Effet d'antioxydants sur la stabilité des bétacyanines de A.S et de B.E à 25°C*

Si les bétacyanines sont sensibles au potentiel redox l'addition de composés antioxydants devraient améliorer leur stabilité. Les tests avec l'acide ascorbique (et son isomère l'acide isoascorbique) et l' α -tocophérol donnent des résultats positifs dans l'ensemble (tableau III).

TABLEAU III : *Effet d'antioxydants sur la stabilité des bétacyanines de A.s et de B.E à 25°C*

	Témoin	Acide Ascorbique			Acide isoascorbique			α -tocophérol 100 ppm
		100 ppm	1000 ppm	10000 ppm	100 ppm	1000 ppm	10000 ppm	
T1/2 (A S)	620	581	777	560	786	869	777	645
T1/2 (B.E)	1519	1424	1044	1375	1927	213 2	1905	1383

Bien que l'acide ascorbique dans certains cas entraîne une diminution de stabilité, son isomère l'acide isoascorbique a un effet stabilisateur régulier avec un maximum à 1000ppm. Cet effet versatile de l'acide ascorbique a été observée aussi par Reynoso et al.^[8] lors de l'étude de bétacyanines de cactacées mexicaines. Cela s'expliquerait par le fait qu'en présence de métaux (comme le fer) et d'oxygène moléculaire l'acide ascorbique s'oxyde puis provoque l'oxydation des bétacyanines^[8].

L' α -tocophérol, a un effet antioxydant moindre que celui de l'acide isoascorbique. Ce composé est reconnu pour sa capacité d'inhibition des réactions radicalaires, car il favorise la phase de terminaison de ces réactions. Cela pourrait signifier qu'une part de l'oxydation dégradative des bétacyanines se fait selon un mécanisme radicalaire.

Des résultats précédents il ressort qu'il existe au moins deux mécanismes de dégradation des bétacyanines : l'hydrolyse (majoritaire) et l'oxydation.

3. 4 - Effets de séquestrants sur la stabilité des bétacyanines de AS et de BE

La vulnérabilité hydrolytique des bétacyanines étant due à la fragilité de la liaison aldimine (à cause de la fonction ammonium IV) tout composé capable de protéger ce site devrait stabiliser ces pigments.

L'addition de sels d'acide citrique ou d'EDTA entraîne une amélioration de la stabilité des bétacyanines (tableau IV). L'effet stabilisateur de l'EDTA est supérieur à celui de l'acide citrique. Le rôle stabilisateur de ces deux composés chimiques testés pourrait être lié à un mécanisme de séquestration qui neutraliserait alors partiellement le centre sensible (électrophile) de la molécule^[6].

TABLEAU IV : Effets de séquestrants sur la stabilité des bétacyanines de AS et de BE à 25°C

	Témoïn	Acide citrique 10000ppm	EDTA 10000ppm
T1/2 (A S)	700	1013	1035
T1/2 (B.E)	1613	2336	2386

Ces résultats permettent d'énoncer l'hypothèse suivante pour la réaction d'hydrolyse: une attaque par un nucléophile sur l'ammonium quaternaire pourrait expliquer la fragilisation de la liaison aldimine, facilitant ainsi son hydrolyse. En effet, à pH 5,5 les sels d'acide citrique et d'EDTA comportent des carboxyles dissociés qui pourraient séquestrer, par chélation, l'ammonium IV. D'autres parts ces séquestrants pourraient aussi chélater les cations métalliques capables de catalyser l'oxydation destructrice des bétacyanines^[8].

IV - CONCLUSION

Une fois extraites, les bétacyanines de ces deux espèces (AS et BE) semblent très sensibles aux facteurs ambiants (température, pH) et aux additifs chimiques. Les bétacyanines de *Boerhaavia erecta* sont plus stables que celles d'*Amaranthus spinosus*, et de *Beta vulgaris*^[6]. De cette étude, il ressort donc que les bétacyanines des deux espèces étudiées sont thermo-sensibles (assez rapidement détruites à des températures supérieures à 30°C), préfèrent les pH moyennement acides (5-6) et sont détruites par certains cations métalliques. Aussi, la dégradation majeure se faisant par hydrolyse, les milieux de faible humidité seront protecteurs. Pour toutes ces raisons, les bétacyanines de ces deux espèces pourraient être utilisées, pour colorer des produits laitiers et jus de fruits après pasteurisation, les produits alimentaires

deshydratés, ainsi que des aliments congelés. Ces utilisations devraient être précédées d'une étude de la toxicité des extraits de bétacyanines.

Dans la perspective d'une meilleure amélioration de la stabilité des bétacyanines de ces deux espèces, on pourrait envisager l'élucidation des structures moléculaires de ces bétacyanines. Aussi, il faudrait déterminer les mécanismes biochimiques de stabilisation *in vivo* dans les deux plantes.

BIBLIOGRAPHIE

[1] - PIATTELLI M. BETALAINS. In Chemistry and biochemistry of plant pigments, 2nd ed. Academic press , 1976, London. pp 560-596

[2] - VON ELBE J.H. The betalains. In Current aspects of food colorants, T.E.Furia Ed.,1977,Cleveland. pp. 29-39

[3] - ODILE O.G. NACOULMA. Thèse de doctorat d'état. Université de Ouagadougou 1996 .

[4] - WALFORD J. Developments in food colors-1. Applied sciences Publishers ltd Ed.,1980, London .

[5] - NILSSON T. LANTBRUKSHOEGSKOLANS annal. (1970) 36, 179-183

[6] - PASCH J.H., VON ELBE J.H. J. Food Sci., (1979) 44 , 72-75

[7] - Schliemann W., Strack D. Phytochemistry (1998) 49, 2, 595-598.

[8] - REYNOSO R., GARCIA J.A., MORALEZ D , GONZALEZ DE MEIJA E. J.Agric.food chem. (1997) 45, 2884-2889

[9] - ATTOE E. L. and VON ELBE J.H. Z.Lebensm.Unters. Forsch.press (1984). 90 ,134-139.

[10] - VON ELBE J.H. and GOLDMAN I.L. The Betalains. In Natural food colorants. Marcel Dekker Ed, 2000, New york pp.11-30

[11] - CAPON B. Organic reaction mechanism. Intersciences publishers ed., 2001, New york. p.401