



HAL
open science

Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee : development of analytical methods and study of the roasting process

Justin Koffi Houessou

► **To cite this version:**

Justin Koffi Houessou. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee : development of analytical methods and study of the roasting process. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2007. English. NNT : 2007AGPT0002 . pastel-00003108

HAL Id: pastel-00003108

<https://pastel.hal.science/pastel-00003108>

Submitted on 20 Nov 2007

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

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



Ecole Doctorale ABIES
Laboratoire de Chimie Analytique

THÈSE

pour obtenir le grade de
Docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
Discipline : Chimie Analytique

présentée et soutenue publiquement par
Justin Koffi HOUESSO

le 1^{er} février 2007

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café : mise au point de méthodes analytiques et étude de l'étape de torréfaction

Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee : development of analytical methods and study of the roasting process

Directeur de thèse
Valérie CAMEL

Devant le Jury ci-dessous

Dr. H. BUDZINSKI	CNRS, Talence	Rapporteur
Dr. V. PICHON	ESPCI, Paris	Rapporteur
Pr. D. RUTLEDGE	AgroParisTech, Paris	Président
Dr. E. CROS	CIRAD, Montpellier	Examineur
Dr. L. DEBRAUWER	INRA, Toulouse	Examineur
Dr. B. HEYD	AgroParisTech, Massy	Examineur
Dr. V. CAMEL	AgroParisTech, Paris	Examineur

Remerciements

Au terme de ce travail de recherche réalisé au Laboratoire de Chimie Analytique de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, je me permets de prendre quelques temps de réflexion pour regarder en arrière et voir le trajet parcouru pendant toutes ces années afin d'exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui de près ou de loin, m'ont accompagné et soutenu pour mener à bien cette thèse.

A Monsieur Douglas Rutledge, Professeur à l'INA P-G, qui m'a accueilli au sein du laboratoire de Chimie Analytique dont il est le directeur, et qui a accepté de participer à mon jury de thèse, tous mes remerciements, et qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Au Dr. Valérie Camel, ma directrice de thèse, de qui j'ai beaucoup appris depuis mon année de D.E.A et sans qui je n'aurais jamais terminé cette thèse à temps. Je la remercie du fond du cœur pour toute l'aide et le soutien qu'elle m'a apportés du début jusqu'à la fin de ma thèse. Je lui suis reconnaissant de m'avoir encadré avec autant de soin et d'avoir eu la patience de me former en tenant compte de mes capacités. Merci pour ta gentillesse. Merci pour tout. Pardon pour tout le stress que je t'ai occasionné.

A Messieurs Christian Ducauze et Alain Bermond, tous deux Professeurs à l'INA P-G, tous mes remerciements et sympathies.

Au Dr. Luc Eveleigh, mes sincères remerciements pour l'aide qu'il m'a apportée au cours de mes différentes analyses réalisées en GC-MS/MS.

A Monsieur Bertrand Heyd, Maître de Conférences à l'ENSIA de Massy, qui m'a aidé à réaliser la dernière partie de mon travail sur la torréfaction et qui a accepté de participer à mon jury de thèse, toute ma gratitude et mes sincères remerciements.

Au Dr. Goujot Daniel, mes sincères remerciements pour son aide.

Je remercie l'ensemble du jury, Messieurs Laurent Debrauwer, Ingénieur de Recherche à l'INRA de Toulouse, Emile Cros, Chercheur au CIRAD, et plus particulièrement les rapportrices Mesdames Valérie Pichon, Maître de Conférences à l'ESPCI, et Hélène Budzinski, Directrice de Recherche au CNRS de Talence.

Je remercie également Than Bui pour son soutien moral et pour son excellent thé qu'il m'a toujours offert.

Je suis très reconnaissant à Nastaran et à Nongrat pour avoir accepté de m'aider à finaliser ma liste bibliographique.

Un grand merci aussi à Stéphane, Stéphanie, Hamida, Elias, Rui, Delphine, Corine, Claude Narcisse, Brigitte, Ali, Camille, Nathalie et Riadh.

Grand merci également à tous mes amis thésards et stagiaires du laboratoire et je leur souhaite une bonne continuation.

Merci à tous mes parents qui de loin ou de près m'ont soutenu, et tout particulièrement à ma grande Georgette Houessou, Christ-Emmanuel Houessou, Robert, Odile Guehi et une pensée toute particulière à maman Thérèse qui m'a toujours permis de prendre la vie du bon côté.

Publications et communications relatives à ce travail

- **Publications**

Articles dans des revues internationales à comité de lecture

Houessou J.K., Benac C., Delteil C., Camel V. (2005) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew using solid-phase extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 871-879.

Houessou J.K., Delteil C., Camel V. (2006) Investigation of sample treatment steps for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in ground coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7413-7421.

- **Communications**

Communications par affiche

Houessou J., Delteil C., Camel V. (2004) Détermination de traces d'hydrocarbures aromatiques polycycliques dans des échantillons de café. Poster; *Congrès Forum Labo*, 23-26 mars, CNIT-Paris La Défense.

Houessou J., Lévêque A.-S., Delteil C., Jouan-Rimbaud Bouveresse D., Goujot D., Heyd B., **Camel V.** (2006) Evolution des concentration en hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café au cours de la torréfaction. **Poster**; *Rencontres de l'INA*, 29 mai, Grignon.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

A	Constante d'Arrhénius
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
ASE	Extraction accélérée par solvant (voir aussi PSE)
C	Catalyseur inconnu
C _i	Valeurs des neurones
CID	Dissociation induite par collision
Conc	Concentration
C _{moulu}	Concentration du composé dans le café moulu
C _{liquide}	Concentration du composé dans le café liquide
C _t	Coefficient de transfert (en %)
DAD	Détecteur à barrette de diodes (<i>diode array detector</i>)
E	Somme des carrés des erreurs
E _a	Energie d'activation
ENSIA	Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires
EtOH	Ethanol
FD	Détecteur de fluorescence
GC	Chromatographie en phase gazeuse
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
[HAP]	Concentration en HAP
[HAP] ₀	Concentration initiale en HAP
[HAP] _{exp}	Concentration expérimentale en HAP
[HAP] _{simul}	Concentration simulée en HAP
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IC	Intervalle de confiance (à 95%)
I _p	Produit inactif
INA P-G	Institut National Agronomique Paris-Grignon
k _i	Constante de vitesse du composé i.
kJ	kiloJoule
K _{ow}	Coefficient de partage octanol-eau

L	Litre
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
m	Ordre de la réaction
MeOH	Méthanol
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem (ou MS ²)
min	Minute
mL	Millilitre
msec	Milliseconde
nd	Non détecté
np	Expérience non réalisée
[P]	Concentration de P
ppb	Partie par billion
PS-DVB	Copolymère polystyrène-divinylbenzène.
PSE	Extraction par un solvant chaud sous pression (voir aussi ASE)
PTV	Injecteur vaporisateur à température programmable
q	Energie d'excitation maximale
r ²	Coefficient de corrélation
R	Constante des gaz parfaits
RSD	Ecart-type relatif (<i>relative standard deviation</i>)
s	Seconde
SIM	Mode de sélection des ions (<i>selected ion monitoring</i>)
SD	Ecart-type absolu (<i>standard deviation</i>)
SPE	Extraction en phase solide (<i>solid phase extraction</i>)
t	Temps
T	Température
TEF	Facteur d'équivalent toxique
TEQ	Equivalent toxique
THF	Tétrahydrofurane
US EPA	Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis
UV	Ultraviolet
V	Volt
w _{ij}	Poids

w_{31}	Biais
Σ	Somme
μs	Microseconde

ABREVIATIONS (HAP)

N	Naphtalène
Acyl	Acénaphtylène
Ace	Acenaphtène
Fle	Fluorène
Phen	Phénanthrène
Anthr	Anthracène
F	Fluoranthène
Pyr	Pyrène
B[a]A	Benzo[a]anthracène
Chrys	Chrysène
B[b]	Benzo[b]fluoranthène
B[k]F	Benzo[k]fluoranthène
B[a]P	Benzo[a]pyrène
DB[ah]A	Dibenzo[a,h]anthracène
B[ghi]P	Benzo[g,h,i]pérylène
I[cd]P	Indéno[1,2,3-c,d]pyrène

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : LE CAFE

Tableau 1.1 : Composition des grains de café verts et torréfiés selon la variété (en pourcentage de la matière sèche).	16
Tableau 1.2 : Répartition des acides aliphatiques dans le café vert selon la variété (pourcentage de matière sèche)	18
Tableau 1.3 : Teneurs moyennes en acides chlorogéniques selon la variété de café vert (pourcentage en masse par rapport à la matière sèche).	19
Tableau 1.4 : Répartition des différents acides aminés (somme des énantiomères D- et L-) dans le café vert selon la variété (en pourcentage de matière sèche)	20
Tableau 1.5 : Composition moyenne en glucides des grains de café vert [Debry (1987)].	21
Tableau 1.6 : Composition moyenne en lipides des grains de café vert	22
Tableau 1.7 : Répartition des différents stérols dans le café vert selon la variété	24
Tableau 1.8 : Composition en minéraux des grains de café verts selon la variété et le mode de production (en pourcentage de la matière sèche)	25
Tableau 1.9 : Concentrations estimées en acides aliphatiques dans deux types de café ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	28
Tableau 1.10 : Glucides du café vert et du café torréfié [Debry (1987)].	32
Tableau 1.11 : Teneurs en éléments majeurs et mineurs dans divers types de cafés	34
Tableau 1.12 : Teneurs en cafestol et kahweol de différents cafés boissons	39
Tableau 1.13 : Les composés volatils extraits du café boisson (café turc) par SPME en immersion directe	40
Tableau 1.14 : Concentrations estimées en HAP de différents cafés verts, torréfiés et instantanés.	47
Tableau 1.15 : Concentrations estimées en HAP de différents cafés boissons, et coefficients de transfert correspondants.....	49
Tableau 1.16 : Récapitulatif des procédures analytiques décrites pour la détermination des HAP dans le café moulu et instantané.....	50
Tableau 1.17 : Récapitulatif des procédures analytiques développées pour analyser les HAP dans le café boisson.....	52
Tableau 1.18 : La formation des HAP dans les aliments et leurs précurseurs possibles.	54

CHAPITRE 2: MATERIELS ET METHODES

Tableau 2.1 : Les solvants utilisés et leur degré de pureté.....	60
Tableau 2.2 : Caractéristiques des produits et réactifs utilisés.....	61
Tableau 2.3 : Conditions de SPE testées sur copolymère PS-DVB.....	63
Tableau 2.4 : Description des différentes expériences effectuées en PSE avec une purification in situ (IS) lors de l'extraction.....	67
Tableau 2.5 : Description des différents essais effectués en PSE et les types de cartouches utilisées pour la purification par SPE.....	68
Tableau 2.6 : Description des différents essais et des types de cartouches utilisées pour la purification par SPE après l'extraction PSE.	70
Tableau 2.7 : Description des différentes expériences effectuées en PSE avec une saponification (SAP) réalisée après l'extraction.	71
Tableau 2.8 : Description des expériences menées en effectuant du dopage (DOP) à différentes étapes de la procédure analytique mettant en œuvre la PSE et une saponification.	73
Tableau 2.9 : Description des expériences menées lors de l'étude des conditions de torréfaction.	76
Tableau 2.10 : Choix des conditions de mise en œuvre de la GC-MS/MS.....	80
Tableau 2.11 : Temps de rétention des 16 HAP en GC-MS/MS.	80

CHAPITRE 3 : MISE AU POINT DE PROCEDURES ANALYTIQUES POUR LA DETERMINATION DES HAP DANS LE CAFE

Tableau 3.1 : Taux de récupération moyens et intervalles de confiance (IC) à 95% pour les trois HAP modèles dans deux cafés moulus dopés après extraction PSE (n = 3).....	85
Tableau 3.2 : Taux de récupération moyens (et écarts-types relatifs) dans chaque fraction d'élution pour les trois HAP modèles dans du café moulu après extraction PSE et purification sur silice.....	90
Tableau 3.3 : Taux de récupération moyens (et écarts-types relatifs) dans des extraits PSE de café Colombie pour lesquels le dopage a été fait ultérieurement, soit juste avant concentration et saponification, soit juste avant la SPE sur silice, soit juste avant l'évaporation finale (n = 2).	93
Tableau 3.4 : Influence du solvant d'extraction sur les taux de récupération moyens (et écarts-types relatifs) après extraction PSE (100°C) de café moulu de Colombie dopé, suivie d'une	

saponification, partage liquide-liquide et purification sur silice (n = 2 sauf pour l'hexane/acétone 94/6 où n = 1).	96
_Toc160208341	
Tableau 3.5 : Influence de la température d'extraction sur les taux de récupération moyens (et écarts-types relatifs) après extraction PSE (avec de l'hexane-acétone 50/50 v/v) de café moulu de Colombie dopé, suivie d'une saponification, partage liquide-liquide et purification sur silice (n = 2).....	98
Tableau 3.6 : Taux de récupération des HAP dans le café de Colombie moulu dopé, après extraction par Soxhlet (suivie d'une saponification, partage liquide-liquide et purification sur silice) ou après saponification directe (suivie d'un partage liquide-liquide et d'une purification sur silice) (n = 2 pour le Soxhlet, n = 3 pour la saponification directe).....	100
_Toc160208345	
Tableau 3.7 : Performances de la méthode développée pour la détermination des HAP dans le café moulu.	105
Tableau 3.8 : Concentrations moyennes ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) et écarts-types relatifs (RSD) estimés pour les HAP dans différents cafés moulus : mélange L'Or et cafés originaires d'Amérique latine (n = 3 sauf pour Colombie lot 04265 : n = 4).	106
_Toc160208348	
Tableau 3.9 : Concentrations moyennes ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) et écarts-types relatifs (RSD) estimés pour les HAP dans différents cafés moulus : cafés originaires d'Afrique et d'Asie (n = 3).....	107
_Toc160208350	
Tableau 3.10 : Concentrations moyennes ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) estimées pour les HAP dans différents cafés moulus, soit par GC-MS/MS, soit par HPLC-FD.....	113
Tableau 3.11 : Rendements moyens de récupération obtenus pour les 3 HAP étudiés après SPE sur PS-DVB 0.2 g, avec différents mélanges MeOH/THF comme solvants d'élution..	116
Tableau 3.12 : Rendements moyens de récupération obtenus pour les 3 HAP étudiés après SPE sur cartouche remplie avec 0.5 g d'adsorbant.	120
_Toc160208355	
Tableau 3.13 : Influence d'une étape de lavage sur la récupération des 3 HAP étudiés après SPE sur PS-DVB 0.5 g.	124
_Toc160208357	
Tableau 3.14 : Performances de la méthode SPE développée pour la détermination des HAP dans le café boisson.....	127
Tableau 3.15 : Application de la procédure SPE retenue sur différents échantillons de café boisson dopés.	128
_Toc160208360	
Tableau 3.16 : Concentrations estimées pour les trois HAP modèles dans divers cafés boissons après extraction SPE.....	129
Tableau 3.17: Taux de récupération des HAP* après saponification d'un échantillon de café boisson dopé (café Colombie lot-04036-05/02/2006), suivie d'un partage liquide-liquide et d'une purification par SPE sur silice.....	133
Tableau 3.18 : Concentrations moyennes ($\mu\text{g.L}^{-1}$) estimées pour les HAP dans différents cafés boissons, et coefficients de transfert Ct correspondants..	135

CHAPITRE 4 : INFLUENCE DE LA TORREFACTION SUR LA PRESENCE DES HAP DANS LE CAFE

Tableau 4.1 : Influence de la durée de torréfaction (pour une température de l'air entrant de 260°C) sur les teneurs en HAP du café moulu.....	140
Tableau 4.2 : Les constantes de vitesse estimées en supposant un ordre 0 pour la réaction de formation des HAP analysés dans les échantillons de café torréfié à 260°C.....	147
Tableau 4.3 : Les constantes de vitesse estimées en supposant un ordre 2 pour la réaction de formation des HAP analysés dans les échantillons de café torréfié à 260°C.....	149
Tableau 4.4 : Influence de la température de l'air entrant dans le torréfacteur sur les teneurs en HAP du café ENSIA(torréfaction pendant 5 min).	152
Tableau 4.5 : Influence de la température de l'air entrant dans le torréfacteur sur les teneurs en HAP du café INA-PG (torréfaction pendant 5 min).	153
Tableau 4.6 : Influence de la température de l'air entrant dans le torréfacteur sur les teneurs en HAP du café INA-PG (torréfaction pendant 20 min).	156
Tableau 4.7 : Influence de la température de l'air entrant dans le torréfacteur sur les teneurs en HAP du café INA-PG (torréfaction pendant 20 min).	157
Tableau 4.8 : Estimation des énergies d'activation des réactions de formation des HAP analysés dans les échantillons de café torréfié.	161
Tableau 4.9 : Valeurs apparentes ajustées pour les paramètres du modèle dans le cas du benzo[a]anthracène et du chrysène.	164
Tableau 4.10 : Sommes des carrés des erreurs (entre les valeurs données par le modèle et les concentrations estimées par nos analyses) pour chaque HAP selon le modèle testé (pour ces simulations, seules les expériences menées avec le café vert ENSIA torréfié ont été considérées).....	166
Tableau 4.11 : Concentrations moyennes en HAP dans le café boisson obtenu après torréfaction du café en grains à différentes températures pendant 5 min.....	173
Tableau 4.12 : Concentrations moyennes en HAP dans le café boisson obtenu après torréfaction du café en grains à différentes températures pendant 20 min.....	174
Tableau 4.13 : Coefficients de transfert (C_t) estimés pour les HAP dans le café boisson obtenu à partir de café torréfié pendant 5 min à différentes températures.	176
Tableau 4.14 : Coefficients de transfert (C_t) estimés pour les HAP dans le café boisson obtenu à partir de café torréfié pendant 20 min à différentes températures.	176

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : LE CAFE

Figure 1.1 : (a) Un exemple de caféier (<i>Coffea arabica</i>), (b) les fruits de caféier (<i>Coffea arabica</i>).....	5
Figure 1.2 : Les différentes étapes de la production des grains de café.....	7
Figure 1.3 : Structure du fruit et de la graine du caféier.....	8
Figure 1.4 : (a) Séchage traditionnel à la main des cerises de caféier; (b) café en coque.....	9
Figure 1.5 : Illustration de l'étape de dépulpage en Indonésie.....	10
Figure 1.6 : Café en parche.....	11
Figure 1.7 : Illustration de différents types de cafetière : (a) cafetière à filtre,(b) cafetière à piston, (c) cafetière napolitaine, (d) percolateur, (e) cafetière arabe.....	15
Figure 1.8 : Structures chimiques de (a) la caféine, (b) la trigonelline.....	17
Figure 1.9 : Structures chimiques des deux diterpènes caractéristiques du café.....	24
Figure 1.10 : Voies de décomposition de l'acide chlorogénique lors de la torréfaction du grain de café.....	29
Figure 1.11 : Représentation des réactions chimiques se produisant lors de la torréfaction (réaction de Maillard et dégradation de Strecker).....	30
Figure 1.12 : Représentation schématique du devenir des polysaccharides du café au cours de la torréfaction du grain.....	32
Figure 1.13 : Mécanisme proposé pour la formation du naphthalène, phénanthrène et chrysène à partir du phénol.....	55
Figure 1.14 : Profils de concentration théoriques dans le cas d'une formation des HAP par un processus en 2 étapes.....	56

CHAPITRE 2: MATERIELS ET METHODES

Figure 2.1 : Les différents essais menés à partir d'une extraction par un solvant chaud sous pression.....	67
Figure 2.2 : Les procédures analytiques mettant en œuvre (a) une extraction par Soxhlet, (b) une saponification directe.....	74
Figure 2.3 : Schéma de principe du torréfacteur à lit fluidisé mis en œuvre dans ce travail [Valdovinos Tijerino (2005)]......	75
Figure 2.4 : Chromatogramme obtenu à partir d'un étalon (1ppm) par la méthode GC-MS/MS.....	81

CHAPITRE 3 : MISE AU POINT DE PROCEDURES ANALYTIQUES POUR LA DETERMINATION DES HAP DANS LE CAFE

Figure 3.1 : Chromatogramme d'un extrait de café moulu dopé obtenu par PSE (100°C, hexane) et purification in situ avec de l'alumine – Café Ethiopie (lot 3143101/06_2004). 86

Figure 3.2 : Taux de récupération moyen des 3 HAP modèles analysés dans la fraction 1 recueillie après SPE sur silice greffée C18. Le dopage en HAP a été effectué soit sur le café moulu avant son extraction PSE, soit sur l'extrait PSE recueilli après extraction PSE de café moulu non dopé (n = 3, valeurs moyennes ± écarts-types). 87

Figure 3.3 : Taux de récupération moyen des 3 HAP modèles après percolation sur cartouche de silice greffée octadécyle d'un volume donné de solvant dopé (n = 3, valeurs moyennes ± écarts-types).	88
Figure 3.4 : Chromatogramme d'un extrait de café moulu dopé obtenu par PSE (100°C, hexane/acétone 94/6 (v/v)) et purification sur cartouche de silice greffée octadécyle – Café Colombie (lot 03334).	89
Figure 3.5 : Taux de récupération moyens (somme des 2 fractions d'élution) des 3 HAP modèles dans le café moulu dopé, après extraction PSE à deux températures différentes suivie d'une purification sur cartouche de silice (n = 3, valeurs moyennes ± intervalles de confiance à 95%).	90
Figure 3.6 : Chromatogramme d'un extrait de café moulu dopé obtenu par PSE (150°C, hexane) et purification sur cartouche de silice – Café Colombie (lot 03259).	91
Figure 3.7 : Taux de récupération moyens des 3 HAP modèles rajoutés soit avant la PSE (dopage du café moulu), soit après la PSE (dopage de l'extrait recueilli) ; dans les deux cas une purification est effectuée sur cartouche de silice (n = 3, valeurs moyennes ± intervalles de confiance à 95%).	92
Figure 3.8 : Taux de récupération moyens des HAP après extraction PSE de café moulu, et dopage à différentes étapes de la procédure analytique (n = 2, valeurs moyennes ± écarts-types).	93
Figure 3.9 : Influence de la nature du solvant d'extraction PSE sur les taux de récupération moyens des HAP dans le café moulu dopé (n = 2, valeurs moyennes ± écarts-types).	97
Figure 3.10 : Influence de la composition du mélange hexane/acétone utilisé en PSE sur les taux de récupération moyens des HAP dans le café moulu dopé (n = 2 pour hexane-acétone 50/50, valeurs moyennes ± écarts-types).	97
Figure 3.11 : Influence de la température d'extraction en PSE sur les taux de récupération moyens des HAP dans le café moulu dopé (n = 2, valeurs moyennes ± écarts-types).	99
Figure 3.12 : Comparaison des taux de récupération moyens pour chaque HAP à partir de café moulu dopé, obtenus par extraction PSE à 150°C et extraction Soxhlet (n = 2, moyennes ± écarts-types).	101
Figure 3.13 : Chromatogrammes d'extraits de café moulu dopé obtenus par extraction PSE ou Soxhlet. (a) PSE (150°C, hexane/acétone 50:50 (v/v)) – Café Colombie (lot 04265) ; (b) Soxhlet – Café Colombie (lot 04037).	102
Figure 3.14 : Comparaison des taux de récupération moyens pour chaque HAP à partir de café moulu dopé, obtenus par extraction PSE à 150°C (n = 2) et saponification directe (n = 3) (moyennes ± écarts-types).	103
Figure 3.15 : Chromatogramme d'un extrait de café moulu dopé obtenu par saponification directe – Café Colombie (lot 040367).	103

Figure 3.16 : Evaluation des concentrations en HAP toxiques et non toxiques pour 11 HAP analysés dans divers cafés moulus (n = 3) (moyennes \pm écarts-types).....	107
Figure 3.17 : Chromatogramme obtenu par HPLC-UV-DAD (à 254 nm) pour un échantillon de café Colombie non dopé (lot 04265, 21/09/2006).....	108
Figure 3.18 : Comparaison des spectres UV obtenus pour une solution standard et un échantillon de café Colombie non dopé.....	109
Figure 3.19 : Chromatogramme obtenu par GC-MS/MS pour un échantillon de café Ethiopie-Inde non dopé.....	110
Figure 3.20 : Comparaison des spectres de masse MS ² obtenus pour le fluoranthène et le benzo[a]anthracène dans une solution standard et un échantillon de café Colombie.....	111
Figure 3.21 : Comparaison des spectres de masse MS ² obtenus pour le benzo[a]pyrène dans une solution standard et un échantillon de café Mélange L'Or.....	112
Figure 3.22 : Chromatogramme d'un extrait de café moulu non dopé d'origine Brésil (analyse par GC-MS/MS).....	113
Figure 3.23 : Bilan des différentes fractions recueillies afin d'estimer les pourcentages de récupération des HAP (% Récup.) lors des étapes de SPE, ainsi que la fraction en HAP adsorbée sur les parois du bécher ayant contenu le café boisson.....	115
Figure 3.24 : Influence de la nature du solvant d'élution sur les taux de récupération des HAP après deux extractions SPE successives du café boisson sur PS-DVB 0.2 g (n = 3 ; taux de récupération moyens \pm écart-type).....	117
Figure 3.25 : Rendements de récupération (%) des 3 HAP contenus dans le café boisson et l'eau milli-Q dopés après l'étape de SPE 1 (n = 3, taux de récupération moyens \pm intervalles de confiance à 95%).....	119
Figure 3.26 : Influence de la nature et de la masse d'adsorbant contenu dans la cartouche SPE sur la récupération après SPE des HAP contenus dans le café boisson (n = 3 ; taux de récupération moyens \pm écart-type).....	122
Figure 3.27 : Chromatogramme d'un extrait de café boisson (dopé et non dopé) obtenu par SPE sur PS-DVB 0.5 g – Café Mélange L'Or (lot P5, 23/10/03, 12 :26).....	123
Figure 3.28 : Influence de la nature du solvant de lavage sur la récupération après SPE sur PS-DVB 0.5 g des HAP contenus dans le café boisson de Colombie (n = 3, taux de récupération moyens \pm intervalles de confiance à 95%).....	124
Figure 3.29 : Influence de la nature du solvant de lavage sur la récupération après SPE sur PS-DVB 0.5 g des HAP contenus dans le café boisson d'Ethiopie (n = 1, taux de récupération estimés).....	125

Figure 3.30 : Exemples de chromatogrammes obtenus par HPLC-FD*
 (a) solution étalon des 3 HAP à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$; (b) café boisson dopé avec les 3 HAP, chacun à $2 \mu\text{g.L}^{-1}$; (c) café boisson non dopé. *Détection par fluorescence – 0-10 min 320/510 nm ; 10-29 min 230/410 nm; 29-55 min 250/420 nm..... 131

Figure 3.31 : Exemples de chromatogrammes obtenus par HPLC-UV-DAD (à 254 nm) et spectres UV de quelques pics..... 132
 (a) solution étalon des 16 HAP à $25 \mu\text{g.L}^{-1}$; (b) café boisson non dopé (mélange L'Or lot P5 31-12-03 07 :37)..... 132

Figure 3.32 : Comparaison d'un chromatogramme de café boisson dopé saponifié et d'une solution standard des 16 HAP. 133

Figure 3.33 : Tentative de corrélation entre les coefficients de transfert estimés et l'inverse du logarithme du coefficient de partage octanol-eau des HAP (cafés de Chine, Kenya et Colombie)..... 136

CHAPITRE 4 : INFLUENCE DE LA TORREFACTION SUR LA PRESENCE DES HAP DANS LE CAFE

Figure 4.1 : Répartition des HAP selon leur nombre de cycles pour une torréfaction de durée variable avec une température de l'air entrant de 260°C , et comparaison avec la composition du café vert. 141

Figure 4.2: Schématisation de l'allure des concentrations en fonction du temps pour chacun des hypothèses considérées pour le modèle simplifié..... 144

Figure 4.3 : Corrélations entre les concentrations estimées pour les HAP à 3 cycles détectés dans les échantillons de café et la durée de torréfaction (pour une température de l'air entrant de 260°C)..... 145

Figure 4.4 : Corrélations entre les concentrations estimées pour les HAP à 5 et 6 cycles détectés dans les échantillons de café et la durée de torréfaction (pour une température de l'air entrant de 260°C) 145

Figure 4.5 : Corrélations entre les concentrations estimées pour les HAP à 4 cycles détectés dans les échantillons de café et la durée de torréfaction (pour une température de l'air entrant de 260°C)..... 146

Figure 4.6 : Approximation d'une cinétique d'ordre 0 pour la réaction 2 sur la période 0-10 min pour le chrysène, et 0-8 min pour le pyrène..... 147

Figure 4.7 : Comparaison de données simulées avec les résultats expérimentaux pour le benzo[a]anthracène et le chrysène(à 260°C). Simulation 1 : $k = 0.2 \text{ min}^{-1}$; Simulation 2 : $k = 0.5 \text{ min}^{-1}$; Simulation 3 : $k = 0.1 \text{ min}^{-1}$; Simulation 4 : $k = 0.01 \text{ min}^{-1}$; 148

Figure 4.8 : Approximation d'une cinétique d'ordre 2 pour la réaction 2 dans le cas de l'acénaphène et du benzo[a]anthracène.	149
Figure 4.9 : Comparaison des simulations avec les résultats expérimentaux pour le benzo[a]anthracène et le chrysène (les valeurs des k sont données en min^{-1}).	150
Figure 4.10 : Répartition des HAP selon leur nombre de cycles pour une torréfaction de 5 min à diverses températures de l'air entrant, et comparaison avec la composition du café vert. (a) torréfaction du café vert ENSIA, (b) torréfaction du café vert INA-PG.	154
Figure 4.11 : Corrélations entre les concentrations estimées pour certains HAP détectés dans les échantillons de café et la température de l'air entrant (torréfaction à 5 et 20 min) ; les concentrations estimées pour les échantillons de café vert sont également indiquées sur les figures à titre de comparaison.	158
Figure 4.12 : Répartition des HAP selon leur nombre de cycles pour une torréfaction de 20 min à diverses températures de l'air entrant, et comparaison avec la composition du café vert. (a) torréfaction du café vert ENSIA, (b) torréfaction du café vert INA-PG.	159
Figure 4.13 : Comparaison des données expérimentales et des valeurs simulées par le modèle cinétique pour la formation du benzo[a]anthracène et du chrysène au cours de la torréfaction du café.	163
Figure 4.14 : Résultats obtenus pour les deux lots de café utilisés soit pour l'ajustement du modèle, soit pour sa validation.	164
Figure 4.15 : Illustration d'un réseau de neurones comportant 3 neurones sur la couche cachée.	166
Figure 4.16 : Résultats du modèle à 2 neurones sur la couche cachée pour le benzo[a]anthracène et le chrysène : surfaces de réponse (les points verts correspondent aux concentrations estimées d'après nos analyses) et corrélations obtenues entre les données expérimentales et les données simulées.	168
Figure 4.17 : Confirmation de la présence de 4 HAP par superposition des spectres UV obtenus avec ceux de solutions standards.	169
Figure 4.18 : Comparaison du chromatogramme de la solution étalon des 16HAP (10ppm) et d'un autre chromatogramme de nos échantillons (café torréfié à 240°C, 20 min).	170
Figure 4.19 : Comparaison des spectres de masse MS^2 obtenus pour le chrysène et le benzo[k]fluoranthène dans une solution standard et un échantillon de café Cuba torréfié à 240°C pendant 20 min.	171
Figure 4.20 : Tentative de corrélation entre les coefficients de transfert estimés et l'inverse du logarithme du coefficient de partage octanol-eau des HAP (cafés de Cuba torréfiés dans différentes conditions).	177

INTRODUCTION.....	1
1 LE CAFÉ.....	4
1.1 PRÉSENTATION DU CAFÉ.....	4
1.1.1 <i>Un produit très consommé</i>	4
1.1.2 <i>Le commerce du café</i>	5
1.1.3 <i>Les variétés de café</i>	5
1.1.4 <i>La production des grains de café</i>	6
1.1.5 <i>La production du café moulu et de sa boisson</i>	13
1.2 COMPOSITION DU CAFÉ	16
1.2.1 <i>La composition des grains de café vert</i>	17
1.2.2 <i>La composition des grains de café torréfiés</i>	27
1.2.3 <i>La composition du café boisson</i>	37
1.2.4 <i>Conclusion sur la composition du café</i>	41
1.3 LES EFFETS PHYSIOLOGIQUES DU CAFÉ BOISSON	41
1.3.1 <i>Les effets bénéfiques pour la santé</i>	41
1.3.2 <i>Les effets préjudiciables pour la santé</i>	44
1.4 LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS LE CAFÉ	46
1.4.1 <i>Les teneurs en HAP de divers cafés</i>	46
1.4.2 <i>Les procédures analytiques mises en oeuvre</i>	50
1.4.3 <i>Les sources de contamination du café par les HAP</i>	51
1.4.4 <i>Conclusion sur les HAP dans le café</i>	57
2 MATERIELS ET METHODES	60
2.1 PRODUITS ET RÉACTIFS.....	60
2.1.1 <i>Solvants</i>	60
2.1.2 <i>Standards et réactifs</i>	60
2.1.3 <i>Matériel utilisé pour l'extraction en phase solide</i>	61
2.1.4 <i>Cafés étudiés</i>	62
2.2 MÉTHODES DE TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS DE CAFÉ BOISSON	62
2.2.1 <i>Procédure de préparation du café boisson</i>	62
2.2.2 <i>Extraction en phase solide directe du café boisson</i>	63
2.2.3 <i>Saponification préalable du café boisson</i>	64
2.3 MÉTHODES DE TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS DE CAFÉ MOULU	65
2.3.1 <i>Mise en œuvre de l'extraction accélérée par solvant</i>	66
2.3.2 <i>Mise en oeuvre de l'extraction par Soxhlet</i>	73
2.3.3 <i>Mise en oeuvre d'une saponification alcaline directe</i>	74
2.4 TORRÉFACTION DES ÉCHANTILLONS DE CAFÉ VERT.....	75
2.5 MÉTHODES ANALYTIQUES.....	76
2.5.1 <i>Analyse quantitative des HAP par HPLC-FD</i>	77
2.5.2 <i>Analyse qualitative des HAP par HPLC-UV-DAD</i>	77
2.5.3 <i>Identification des HAP par GC-MS/MS et analyse semi-quantitative</i>	78

3	MISE AU POINT DE PROCÉDURES ANALYTIQUES POUR LA DÉTERMINATION DES HAP DANS LE CAFÉ	84
3.1	DÉTERMINATION DES HAP DANS LE CAFÉ MOULU	84
3.1.1	<i>Choix d'une méthode de purification de l'extrait PSE</i>	<i>84</i>
3.1.2	<i>Choix des conditions de mise en œuvre de l'extraction PSE</i>	<i>95</i>
3.1.3	<i>Intérêt de la mise en œuvre d'une extraction PSE</i>	<i>100</i>
3.1.4	<i>Evaluation des performances de la méthode.....</i>	<i>104</i>
3.1.5	<i>Application à la détermination des HAP dans divers cafés moulus</i>	<i>105</i>
3.2	DÉTERMINATION DES HAP DANS LE CAFÉ BOISSON	114
3.2.1	<i>Optimisation des conditions d'extraction en phase solide.....</i>	<i>114</i>
3.2.2	<i>Mise en œuvre de la méthode SPE retenue</i>	<i>126</i>
3.2.3	<i>Etude de la mise en œuvre d'une étape de saponification</i>	<i>132</i>
3.2.4	<i>Conclusion.....</i>	<i>134</i>
3.3	ESTIMATION DES COEFFICIENTS DE TRANSFERT DES HAP DU CAFÉ MOULU VERS LE CAFÉ BOISSON	134
3.4	CONCLUSION	136
4	INFLUENCE DE LA TORREFACTION SUR LA PRESENCE DES HAP DANS LE CAFE.....	138
4.1	INTRODUCTION.....	138
4.2	ETUDE DES CONDITIONS DE TORREFACTION SUR LA TENEUR EN HAP DU CAFE MOULU	138
4.2.1	<i>Influence de la durée de torréfaction à 260°C.....</i>	<i>139</i>
4.2.2	<i>Influence de la température de torréfaction à durée constante</i>	<i>151</i>
4.2.3	<i>Modélisation avancée de la formation des HAP.....</i>	<i>161</i>
4.2.4	<i>Confirmation de la présence des HAP dans les cafés torréfiés</i>	<i>169</i>
4.2.5	<i>Conclusion.....</i>	<i>172</i>
4.3	ETUDE DES CONCENTRATIONS EN HAP DES CAFES BOISSONS	172
4.3.1	<i>Analyse des cafés boissons préparés à partir de cafés torréfiés pendant 5 min</i>	<i>172</i>
4.3.2	<i>Analyse des cafés boissons préparés à partir de cafés torréfiés pendant 20 min</i>	<i>174</i>
4.3.3	<i>Estimation des coefficients de transfert des HAP</i>	<i>175</i>
4.3.4	<i>Conclusion sur le café boisson.....</i>	<i>177</i>
4.4	CONCLUSION	178
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	180
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	Référence 183

ANNEXES

ANNEXE 1 : Les composés volatils extraits du café torréfié par HS-SPME

ANNEXE 2 : Structures chimiques et propriétés des 16 HAP classés polluants prioritaires par l'US EPA

ANNEXE 3 : Les HAP et leur toxicité

ANNEXE 4: LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE COUPLEE A UN DETECTEUR DE FLUORESCENCE

ANNEXE 5 : LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE COUPLEE A UN DETECTEUR UV

ANNEXE 6 : LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

ANNEXE 7 : EVALUATION DU POTENTIEL TOXIQUE DU MELANGE DES HAP

ANNEXE 8 : IDENTIFICATION DES HAP DANS LES CAFES MOULUS DU COMMERCE PAR GC-MS/MS

ANNEXE 9 : ETUDE DE LA CINETIQUE DE FORMATION DES HAP

ANNEXE 10 : MODELISATION DE LA FORMATION DES HAP A L'AIDE D'UN RESEAU DE NEURONES

ANNEXE 11 : IDENTIFICATION DES HAP DANS LES CAFES MOULUS TORREFIES PAR GC-MS/MS

Introduction

Introduction

Le café constitue l'une des boissons les plus consommées au monde. Sa composition varie selon la variété de café, le mode de production des grains de café vert, et les conditions de leur torréfaction. Par conséquent l'analyse des constituants du café suscite encore aujourd'hui de nombreuses études, qui se justifient par les effets physiologiques de cette boisson.

Plusieurs contaminants peuvent être présents dans le café moulu, et éventuellement se retrouver ensuite dans la boisson préparée. Parmi eux on trouve les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Il s'agit d'une famille de composés organiques neutres et relativement stables, constitués exclusivement de carbone et d'hydrogène, et dont la structure moléculaire comprend au moins deux noyaux benzéniques non substitués, fusionnés dans un arrangement linéaire, angulaire ou en amas. Ces contaminants sont omniprésents dans l'environnement. En effet, ils ont pour origine la pyrolyse (combustion incomplète) ou la carbonisation (combustion complète) de la matière organique et peuvent ainsi provenir de diverses sources. La présence des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café peut avoir deux origines : l'une exogène (principalement une contamination des grains de café verts lors du séchage), l'autre endogène (il s'agit dans ce cas d'une formation in situ dans le grain lorsque celui-ci est torréfié). Leur présence peut s'avérer préoccupante en raison du caractère toxique, voire carcinogène, de certains de ces composés.

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier la contamination du café par ces composés, en essayant de dissocier les deux voies de contamination. Pour ce faire nous avons donc analysé à la fois des cafés verts et des cafés torréfiés. Pour mener à bien cette étude nous avons tout d'abord tenté de développer des procédures analytiques faisant appel à des techniques rapides d'extraction et peu consommatrices de solvant, telles que l'extraction par un solvant chaud sous pression pour le café moulu, et l'extraction sur phase solide pour le café boisson. Ceci a été réalisé sur quelques HAP modèles en dopant les échantillons de café afin d'estimer les rendements de récupération obtenus. L'étude de la mise en œuvre d'une étape de saponification a été également réalisée, car cette étape peut s'avérer nécessaire pour l'élimination des lipides dans certains cas.

Une fois les procédures analytiques mises au point, nous avons étudié les conditions de torréfaction (durée, température) dans un torréfacteur pilote, afin de suivre le devenir des

HAP recherchés au cours de cette étape. La température de l'air entrant dans le torréfacteur a été réglée entre 180 et 260°C, et la durée ajustée entre 5 et 20 min. Nous avons également tenté de simuler la formation des HAP par deux types de modélisation : l'une basée sur la loi d'Arrhénius, et l'autre basée sur un réseau de neurones.

Ce mémoire s'articule en quatre chapitres. La composition du café étant très complexe, nous allons donc débiter ce travail par le chapitre 1 qui consistera à présenter les constituants du café, ses différentes méthodes de traitement, tout en mettant en évidence les différentes réactions qui peuvent avoir lieu. Dans le chapitre suivant nous présenterons les matériels et méthodes mis en œuvre dans ce travail. Les deux chapitres qui suivent sont consacrés aux résultats que nous avons obtenus. Le chapitre 3 reprend les différents essais menés pour la mise au point des méthodes analytiques. Ces méthodes sont ensuite appliquées à l'étude des conditions de torréfaction, et les résultats obtenus sont détaillés dans le chapitre 4.

CHapitre 1:

Le café

1 LE CAFE

Depuis le début du XIXème siècle, la production du café a été en constante augmentation. Il est donc un produit de première importance sur le marché mondial des produits agro-alimentaires.

1.1 Présentation du café

1.1.1 Un produit très consommé

Le café demeure l'un des produits les plus consommés au monde et constitue la deuxième boisson après l'eau. On estime à 400 milliards le nombre de tasses de café bues par an dans le monde, soit environ 12 000 tasses par seconde. En France, le café est un produit de masse depuis une cinquantaine d'années ; il s'est d'abord développé de façon extensive (touchant une population toujours plus importante), puis de manière intensive (augmentation de la consommation par habitant). Le café est particulièrement bu dans les pays scandinaves où la température extérieure incite à consommer des boissons chaudes ; ainsi la Finlande et la Suède sont les plus grands consommateurs de café avec respectivement 13,8 et 13,7 kg / personne annuellement. Paradoxalement, l'Amérique Latine, le plus grand producteur, consomme peu de café, le Brésil faisant l'exception. L'Afrique a aussi une faible consommation intérieure, sauf en Afrique du Nord où la tradition du café est installée [Comité Français du Café].

1.1.2 Le commerce du café

De nos jours, le café est l'un des principaux produits du commerce mondial, puisque c'est la seconde marchandise échangée dans le monde, derrière le pétrole. On estime à 125 millions le nombre de personnes vivant de la caféiculture, dont 25 millions de petits producteurs. Les enjeux économiques et sociaux sont donc extrêmement importants.

Depuis plusieurs années la production mondiale annuelle dépasse les 6 à 7 millions de tonnes de café, alors qu'en 1825 on en produisait seulement 100 000 tonnes. Cette production ne cesse d'augmenter, avec une progression de 20% entre 1997 et 2005, soit deux fois plus vite que la demande. Ceci résulte généralement de volontés politiques de certains pays. Actuellement le plus gros producteur est de loin le Brésil (35% environ du commerce du café), particulièrement l'Etat de Sao Paulo où se situe le port de Santos, premier port caféier du monde. Les autres gros producteurs sont la Colombie (10%) et le Viêtnam (12%), ce dernier étant le plus important producteur de robusta.

1.1.3 Les variétés de café

Le caféier est un arbuste appartenant au genre *Coffea* de la famille des Rubiacées, pouvant atteindre 12 mètres de hauteur et poussant dans la zone intertropicale (**Figure 1.1**). Un caféier n'est rentable qu'au bout de 5 ans et sa durée de vie est de 25 à 50 ans. Il produit des fruits charnus, le plus souvent rouges ou violets, semblables à des cerises (d'où leur appellation « cerises de café ») (**Figure 1.1**). Ces fruits renferment deux noyaux, contenant chacun un grain de café.

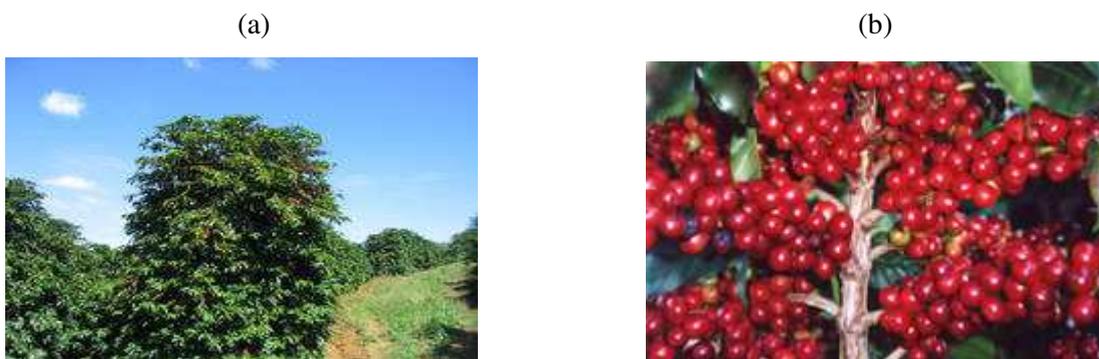


Figure 1.1 : (a) Un exemple de caféier (*Coffea arabica*), (b) les fruits de caféier (*Coffea arabica*)

Il existe un grand nombre d'espèces de caféiers (plus de 80) mais seules deux d'entre elles sont réellement exploitées dans le monde : *Coffea arabica* L. et *Coffea canephora* [Campa et al. (2005a)]. Le café robusta constitue la variété la plus répandue de *Coffea canephora*. Ses grains sont généralement ronds, irréguliers et assez petits, avec un goût corsé, alors que les grains de l'arabica sont plutôt ovales et longs. Ces derniers présentent un goût plus fin et un

arôme plus fruité que les grains de robusta, ce qui explique la plus forte consommation d'arabica de par le monde.

1.1.3.1 L'arabica (*Coffea arabica*)

Originnaire d'Éthiopie, *Coffea arabica* L. comporte de nombreuses variétés. La culture de l'arabica est plus délicate et moins productive que celle du robusta. C'est la raison pour laquelle il est essentiellement cultivé dans des plantations situées entre 1000 et 2000 m d'altitude en climat tropical tempéré par l'altitude, tel que celui de l'Amérique Latine, de l'île de la Réunion ou de l'Indonésie. Il occupe la première place dans le monde pour la production de café (environ 60%) car ses qualités aromatiques sont supérieures à celles du robusta. Son prix est d'ailleurs en moyenne 20 à 25% plus élevé que celui du robusta. Cependant, sa teneur en caféine reste très inférieure : 1% contre 3% pour le robusta [Cafés Malongo].

1.1.3.2 Le robusta (*Coffea canephora*)

Le café robusta est originaire d'Afrique centrale et occidentale. En deuxième place pour la production (40%), il est surtout cultivé en plaine en Afrique (Afrique occidentale, Ouganda, Angola, Afrique du sud, etc.) et en Extrême-orient (Viêtnam, Inde, Indonésie, Philippines). C'est une espèce plus vigoureuse que l'arabica, avec une croissance plus rapide. Son goût est puissant et corsé, il donne un café très tonique [Cafés Malongo].

1.1.4 La production des grains de café

La production des grains de café nécessite différentes étapes successives : la récolte des fruits (ou cerises) – la séparation des grains de café vert des fruits (dépulpage / déparchage)– la torréfaction des grains. Ces différentes étapes sont schématisées sur la **Figure 1.2**.

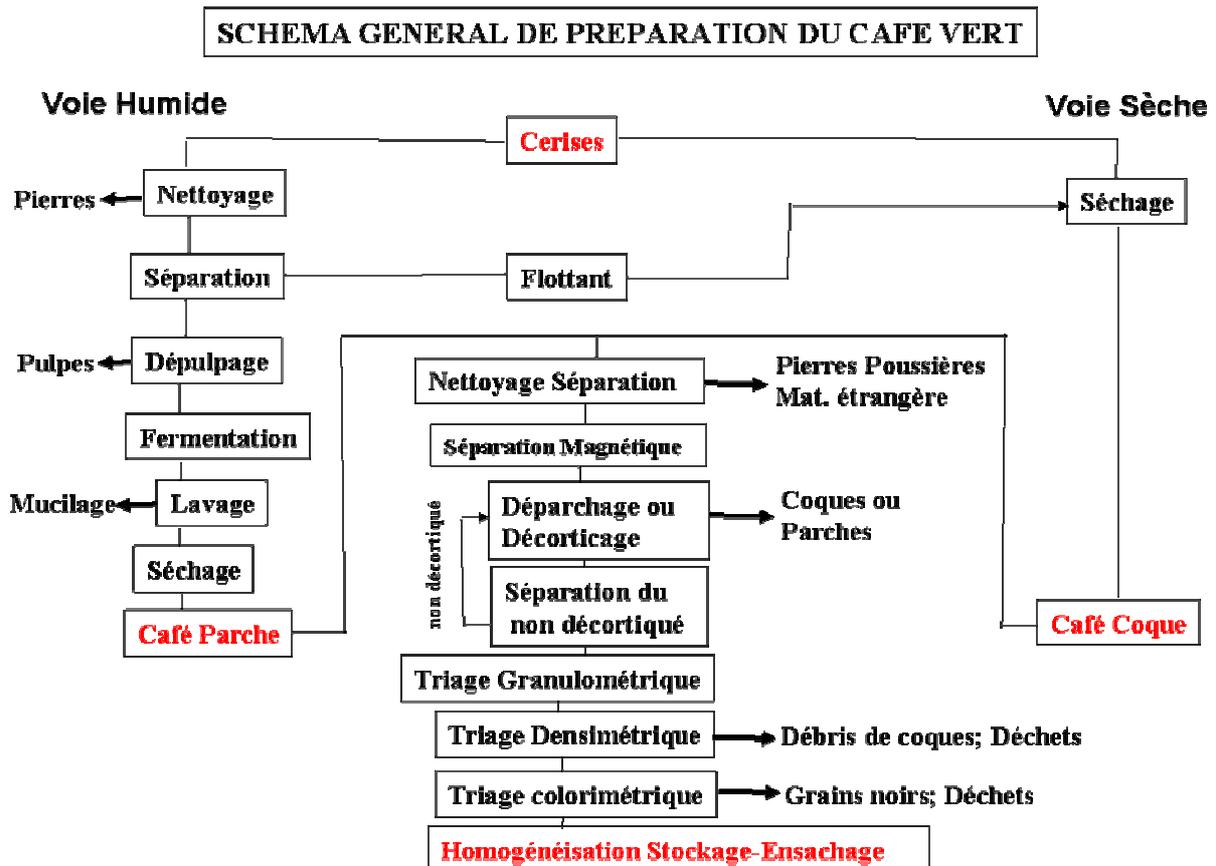


Figure 1.2 : Les différentes étapes de la production des grains de café.

1.1.4.1 La récolte des cerises

Les fruits parviennent à maturité 6 à 8 mois après la floraison pour l'arabica, et 9 à 11 mois après pour le robusta [Montavon et al. (2003)]. La couleur des cerises constitue un bon indicateur de la maturation, car au cours de cette étape la chlorophylle du péricarpe est remplacée par des pigments flavonoïdes rouges.

La meilleure technique de récolte des cerises est celle de la cueillette manuelle des fruits mûrs (également appelée *picking*), car elle produit les meilleures qualités de café. Cependant cette technique reste longue et onéreuse, car elle impose de procéder à plusieurs passages tout au long de la période de mûrissement. La cueillette mécanique est rapide et moins chère, mais elle a l'inconvénient d'imposer un tri secondaire car la quasi-totalité des fruits de la branche sont récoltés, quel que soit leur degré de maturité. La maturation des fruits étant très hétérogène, on peut avoir à la fois des cerises vertes, mûres ou très mûres sur une même branche. Or les cerises immatures augmentent l'amertume du café, tandis que celles trop mûres confèrent à celui-ci un goût acre et désagréable. Il est donc nécessaire de trier les cerises mûres des autres une fois la cueillette mécanique réalisée.

1.1.4.2 L'obtention des grains de café vert

Le fruit du caféier est une sorte de drupe, c'est-à-dire un fruit charnu à noyau. La cerise de café est entourée d'une peau très résistante, lisse et rouge, qui correspond à l'exocarpe (cf. **Figure 1.3**). Celle-ci recouvre le mésocarpe riche en glucides et en pectine, mais surtout en eau (70 à 85%). Le mésocarpe représente, selon les espèces, entre 40 et 65% du poids du fruit et correspond à la pulpe.

Le fruit renferme deux graines qui deviendront les grains de café vert, également appelées fèves. Chaque graine est formée d'un albumen corné recouvert de deux enveloppes, l'une interne (le tégument séminal ou pellicule argentée), l'autre externe (l'endocarpe, également appelé parche ou parchemin).



Figure 1.3 : Structure du fruit et de la graine du caféier.

L'obtention des grains de café vert nécessite donc de dépulper chaque fruit récolté, puis de départer chaque grain. Pour cela, deux méthodes peuvent être mises en œuvre, une méthode dite humide et une méthode dite sèche.

1.1.4.2.1 Méthode sèche

La méthode sèche est plus ancienne et plus simple que la méthode humide, mais ses résultats sont moins performants. Les cerises sont étalées en plein air sur des aires de séchage, et régulièrement brassées pour leur permettre de sécher à l'air libre (cf **Figure 1.4**). En quelques jours, la partie charnue se déshydrate et se désagrège en partie. On reconnaît que les cerises sont séchées lorsqu'en secouant une poignée de café on entend les grains balloter à l'intérieur, les enveloppes deviennent brunes foncées et se durcissent. A ce moment là, les cerises séchées ne contiennent plus que 12 % d'humidité environ.

A l'issue du séchage, le grain de café se trouve encore enfermé dans le noyau du fruit (l'endocarpe) : c'est ce que l'on appelle le café *en coque* (cf **Figure 1.4**). Le café, protégé par sa coque, peut être conservé ainsi pendant un certain temps. Certaines récoltes sont même

vieilles de la sorte afin d'améliorer la saveur du café, car le séchage du grain continue à l'intérieur de la coque.



Figure 1.4 : (a) Séchage traditionnel à la main des cerises de caféier; (b) café en coque.

Afin de récupérer les grains de café vert, l'endocarpe doit être enlevé. Pour ce faire, les grains sont décortiqués par une machine [Cafés Malongo ; Comité Français du Café] Le rendement cerise sèche - fève verte est généralement de 50%: 2 kg de cerises sèches donnent 1 kg de fève verte. Au cours de cette étape, la peau fine argentée (ou tégument) est également enlevée. Les coques sont souvent récupérées et valorisées ensuite comme combustible.

1.1.4.2.2 Méthode humide

La méthode humide étant plus coûteuse que la méthode sèche, elle est généralement réservée aux cafés de qualité cueillis manuellement. Plus compliquée, elle nécessite un certain nombre d'équipements adaptés à chaque étape, mais elle donne un café de meilleure qualité que la méthode sèche.

Dans un premier temps, un nettoyage préliminaire des fruits est effectué, puis ceux-ci sont séparés des autres éléments végétaux par immersion dans l'eau (les cerises mûres sont lourdes, et ainsi séparées des éléments surnageants). Ensuite, l'élimination d'une grande partie de la pulpe est réalisée à l'aide d'un dépulpeur (à cylindres ou à disques), où la pulpe arrachée est évacuée par un courant d'eau (cf **Figure 1.5**).



Figure 1.5 : Illustration de l'étape de dépulpage en Indonésie.

Les grains, une fois dépulvés de la sorte, doivent être démucilaginés afin d'éliminer la pulpe restante. La démucilagation se fait principalement selon deux procédés : par fermentation ou par un procédé mécanique.

• ***La fermentation***

Les grains sont placés dans des bacs à l'abri du soleil pendant quelques jours durant lesquels ils subiront une fermentation, afin de permettre d'enlever plus facilement les restes de mucilage demeurés sur les parches et gênants pour le séchage ultérieur. L'ajout d'enzymes pectiques peut être utilisé pour accélérer artificiellement la fermentation.

• ***Le procédé mécanique***

Comme la fermentation présente des risques de dépréciation du café si elle n'est pas correctement conduite, des appareillages mécaniques (dépulpeur-démucilagineur) ont été construits. Ils sont plus utilisés pour le robusta que pour l'arabica qui, par tradition, est traité par la fermentation.

Quelle que soit la technique de démucilagation utilisée, les grains sont ensuite lavés à l'eau (afin d'éliminer toute trace de mucilage ou pulpe adhérent à la fève), égouttés, puis séchés. Plusieurs méthodes de séchage peuvent être mises en œuvre : la centrifugation, le séchage artificiel, ou encore l'exposition au soleil. Le produit obtenu est le café dit *en parche* car les grains sont toujours recouverts de leur membrane cellulosique (cf **Figure 1.6**). Le café *en parche* séché ne contient plus qu'environ 10 à 15% d'humidité.



Figure 1.6 : Café en parche.

Pour débarrasser le grain de café de sa parche, on fait ensuite subir au grain un départage. Enfin, les grains de café sont polis pour enlever leur pellicule. Le rendement du café en parche en café vert est de 20%.

1.1.4.3 La torréfaction des grains de café vert

La torréfaction est un procédé qui consiste à traiter les grains de café vert par la chaleur sèche et élevée, tout en permettant au café d'acquérir l'essentiel de ses propriétés organoleptiques (couleur, arôme, goût, « corps »). Cette technique permet donc d'accroître progressivement la température dans les torréfacteurs, par chauffage direct, chauffage indirect ou fluidisation dans un courant d'air chaud.

Le chauffage indirect est le procédé le plus utilisé dans l'industrie du café [Guyot (1993)]. Au cours de cette transformation du café, des réactions chimiques se développent et s'accompagnent d'importantes modifications morphologiques (forme, volume, couleur, perte de poids). Les réactions génèrent du dioxyde de carbone, dont une partie s'échappe tandis qu'une autre est retenue dans les cellules du grain [Illy et Viani (1998) ; Schwartzberg (2002) ; Guyot (1993)]. Au cours de la torréfaction du café, il a été mis en évidence trois phases successives [Illy et Viani (1998) ; Guyot (1993) ; Raemy et Lambellet (1982) ; Raemy (1981) ; Oliveira et al. (2005)].

- Une première phase appelée *séchage*, ayant lieu à des températures du grain inférieures à 150-160°C, au cours de laquelle on observe des réactions endothermiques (grâce à un apport extérieur de chaleur). De l'eau et des substances volatiles sont éliminées au cours de cette première phase, et le grain passe de la couleur verte au jaune.
- Une deuxième phase appelée *torréfaction*, exothermique, pour des températures du grain comprises entre 150-160 et 260°C. Elle correspond aux réactions chimiques de dégradation et de polymérisation des précurseurs d'arômes (réactions dites de Maillard et de Strecker, et réactions de pyrolyse). En général, la torréfaction est menée entre 200 et 250°C pendant 0.75

à 25 min, selon le degré de torréfaction souhaité (léger, moyen ou fort), le type de torréfacteur mis en œuvre, ainsi que la nature du café vert initial (variété, teneur en eau, âge du grain, etc.). Au cours de cette phase, le grain subit d'importantes modifications, tant physiques que chimiques comme nous le verrons ultérieurement. De grandes quantités de dioxyde de carbone, d'eau et de substances volatiles sont éliminées, et le grain devient marron (en raison de réactions de caramélisation et de la réaction de Maillard).

- Une troisième phase appelée *refroidissement*, qui s'avère indispensable pour éviter de brûler le grain de café.

Dans certains cas, du sucre peut être rajouté au café avant de le torréfier, afin d'obtenir un café torréfié plus amer et plus foncé.

La torréfaction modifie non seulement la composition des grains comme nous allons le voir par la suite, mais également leur texture [Pittia et al. (2001)]. En effet, juste après la torréfaction, les grains de café sont très friables. Plusieurs raisons à cela : le volume du grain augmente sous l'effet de la pression des gaz produits à l'intérieur du grain par des réactions chimiques (principalement de la vapeur d'eau et du dioxyde de carbone, mais également des produits de pyrolyse), alors que sa masse diminue (perte de gaz et de substances volatiles), ce qui a pour conséquence une baisse de la densité du grain (elle passe d'environ 1200-1300 à environ 600-650 kg.m⁻³) [Franca et al. (2005)]. En outre le grain devient poreux, et la perte d'eau est très importante (environ 5-12% en masse pour le café vert, et seulement 0-5% pour le café torréfié). Pour cette raison, les grains doivent donc être refroidis avant d'être moulus, afin de devenir durs et cassants. Plus la torréfaction a été intense, plus le grain sera facile à mouler. La torréfaction des grains de café est une étape cruciale, qui nécessite donc un contrôle rigoureux afin de maîtriser les réactions chimiques se produisant, et par là même la qualité des grains de café torréfiés. Ces réactions de pyrolyse et de brunissement non-enzymatique (réaction dite de Maillard) modifient la couleur du grain, qui passe du vert au brun plus ou moins foncé selon le degré de torréfaction.

Il est important de souligner que, si les grains de café vert de *Coffea arabica* et *Coffea canephora* peuvent être différenciés à l'œil nu par une personne experte en café (de par des formes et couleurs différentes), ceci n'est plus possible une fois que les grains sont torréfiés, et *a fortiori* moulus. Or, compte tenu du prix plus élevé pour *Coffea arabica*, il est nécessaire de trouver des indicateurs permettant une authentification rapide de la variété de café considérée. Ce point sera discuté plus en détail ultérieurement.

1.1.5 La production du café moulu et de sa boisson

1.1.5.1 La mouture des grains

La mouture consiste à moudre les grains de cafés torréfiés avec des appareils électriques. Au cours de la mouture, le dioxyde de carbone inclus dans le grain de café s'échappe. Bien que réalisée parfois chez le consommateur, elle est plus fréquemment réalisée de manière industrielle. Dans ce cas, le café moulu doit être emballé très rapidement afin d'éviter toute oxydation et perte d'arômes.

Vanier (1983) a proposé que les grains de cafés torréfiés soient moulus à une granulométrie précise et très homogène, ni trop fine, ni trop grosse, pour que l'eau chaude puisse entraîner le maximum de composés aromatiques. En effet, si la mouture est trop grossière, l'eau filtre trop rapidement, et la saveur de la boisson obtenue est fade. A l'inverse, si la mouture est trop fine, l'opération est lente ; elle s'effectue avec de l'eau refroidie, et de plus celle-ci entraîne des particules qui se déposent au fond de la tasse, ce qui donne un café boisson boueux et âcre. C'est donc entre ces deux extrêmes de mouture que se situe la gamme de degrés de finesse qui convient le mieux à chaque type d'appareil. Le degré de finesse de la mouture est spécifique à chaque préparation. En général, on emploie une mouture moyenne pour les cafetières à filtre, une mouture fine pour les appareils à dépression, une mouture plus fine et tassée pour les percolateurs (*café expresso*), et une mouture ultra-fine pour le café à *la turque*.

1.1.5.2 La préparation du café boisson

On dénombre 6 modes de préparation du café, chacun conférant à la boisson obtenue des propriétés organoleptiques et compositions bien distinctes (le café instantané constituant un cas particulier bien spécifique) :

- *La filtration*

Le modèle de cafetière à filtre utilisé est celui inventé par le français Du Belloy au XVIIIème siècle. Cette cafetière présente la particularité d'être constituée de deux parties : la moitié supérieure contenant le filtre recouvert d'un tamis ou d'un disque percé de petits trous sur lequel le café moulu grossièrement est déposé, et la partie inférieure dans laquelle le café boisson est recueilli. On verse un peu d'eau tiède pour gonfler le café puis on ajoute par petites fractions de l'eau à la limite de l'ébullition. Il faut 10 à 12 g de café moulu par tasse et la préparation dure environ dix minutes. Les filtres utilisés sont en acier inoxydable, en papier spécial, en nylon, ou encore en plastique.

- *L'infusion*

Cette méthode requiert l'usage d'une cafetière à piston, inventée par l'italien Caliman en 1933. Sa particularité est de faire infuser le café au lieu de le faire bouillir. Dans un récipient en verre, un filtre sous la forme d'un piston permet la séparation du marc de la boisson en l'isolant au fond du récipient. Après avoir déposé la mouture au fond de la cafetière (on recommande 10 g de mouture par tasse), on verse l'eau frémissante et on laisse reposer 2 min environ. En exerçant une pression le filtre s'enfonce jusqu'au bas, séparant le café du marc.

• *La percolation*

La percolation est le procédé utilisé par les cafetières dites napolitaines. Il fut inventé par le Français Louis-Bernard Rabaud en 1822. La cafetière est constituée de deux compartiments séparés par un porte-filtre métallique dans lequel se trouve la dose de café (mouture fine). L'eau, placée dans le récipient inférieur, bout puis s'évapore lors du chauffage. La vapeur sous pression ainsi formée fait remonter l'eau, qui traverse la mouture avant de monter dans la cheminée, pour retomber finalement dans la verseuse. Le café obtenu est dit à l'italienne (ou café *moka* ou café *napolitain*). Ce procédé ne donne pas les meilleurs résultats car la température trop élevée de l'eau détruit en partie les arômes du café.

• *La percolation sous haute pression ou un espresso*

Un espresso (de l'italien *espresso*, extrait par pression ou très vite), ou café express, est un café très corsé avec un fort arôme, obtenu en faisant passer rapidement de l'eau chaude sous une pression de 9 bars à travers du café finement moulu et torréfié. Cette opération se fait à l'aide d'une cafetière à espresso. En général on utilise, pour une tasse de 35- 67 mL, 14-17 g de café avec une eau de 88-95°C sous une pression minimum de 9 bars et un temps de passage de 22-28 s. Le procédé utilisé permet à l'eau et à la mouture d'avoir un contact minimum, ce qui évite de diluer les saveurs et les arômes.

• *La décoction*

Le café, moulu très finement, est jeté dans l'eau bouillante (dans une cafetière arabe ou tout autre récipient allant directement sur le feu). Après trois ébullitions très courtes et ajout de sucre, le café est versé sans filtration préalable. Cette préparation donne le café *turc* (ou café *grec*), qu'il est nécessaire de boire lentement afin d'éviter le marc restant au fond de la tasse. Il s'agit de la plus ancienne méthode de préparation du café.

• *L'ébullition*

Dans les pays scandinaves, un mode de préparation très prisé consiste à verser le café moulu directement dans de l'eau en ébullition, avant de maintenir le mélange à ébullition pendant 1 à 2 min. Avant consommation, le café bouilli est généralement filtré.

• *La dissolution*

Dans le cas particulier du café instantané, la boisson est préparée en mélangeant simplement du café soluble avec de l'eau bouillante.

La Figure 1.7 illustre les principaux types de cafetière utilisés pour ces multiples modes de préparation du café boisson.



Figure 1.7 : Illustration de différents types de cafetière : (a) cafetière à filtre, (b) cafetière à piston, (c) cafetière napolitaine, (d) percolateur, (e) cafetière arabe.

Au cours de notre travail expérimental, c'est avec une cafetière à filtre que nous avons préparé le café boisson à partir de café moulu, car c'est actuellement l'un des modes de préparation les plus utilisés.

Quel que soit le mode de préparation mis en œuvre, la qualité de l'eau utilisée est à prendre en considération car certaines substances chimiques ou certains sels peuvent dénaturer les arômes. Il est donc souhaitable d'utiliser les eaux faiblement minéralisées et non gazeuses. De plus, le ratio quantité de mouture / volume d'eau est également très important, car il influe directement sur l'efficacité de l'extraction des constituants du café moulu. Or la nature de ces constituants, et donc leur solubilité dans l'eau, est très diversifiée comme nous allons le voir ci-dessous.

1.2 Composition du café

La composition du café est très complexe, avec plus d'une centaine de substances chimiques identifiées. Elle est également variable car les espèces, les variétés végétales et les procédés technologiques contribuent à la diversité des caractéristiques organoleptiques des cafés.

Le facteur influençant le plus fortement la composition du café est avant tout l'espèce et la variété de café vert. Pour une même variété, la composition du café est également fonction, dans une moindre mesure, de la méthode de culture, du degré de maturation des cerises et des conditions de stockage des grains verts. En outre, les procédés technologiques de préparation (dépulpage, déparchage) et de traitement industriel (torréfaction) des grains verts, modifient les teneurs des constituants des grains de café. Enfin, le mode de préparation du café boisson par le consommateur influence directement la composition de la boisson obtenue.

Ainsi que l'écrit Smith (1985) « le café est probablement un des éléments dont la gamme de produits formés au cours des traitements industriels est la plus grande ». De plus, il existe un grand nombre de méthodes analytiques différentes si bien que, malgré les tentatives d'établissement d'une table de composition des cafés, aucune n'a été unanimement admise. Les valeurs moyennes qui sont proposées pour rendre compte de la composition de chaque type de café ne doivent donc être considérées que comme des données approximatives.

Cette étude de la composition du café est limitée à celle des deux principales espèces, *Coffea arabica* L. et *Coffea canephora* (variété robusta). La composition chimique moyenne des grains de café verts et torréfiés est donnée dans le **Tableau 1.1**.

Tableau 1.1 : Composition des grains de café verts et torréfiés selon la variété (en pourcentage de la matière sèche). [d'après Clarke (1987) ; Viani (1993) ; Debry (1987) ; Ky et al. (2001) ; Vasconcelos et al. (2007)].

Composants	<i>Coffea arabica</i>		<i>Coffea canephora</i>	
	Vert	Torréfié	Vert	Torréfié
Caféine	0.8-1.4	0.9-1.6	1.7-4.0	1.2-2.6
Trigonelline	0.6-1.2	0.1-1.2	0.3-1.0	0.1-1.2
Acides aliphatiques	1.0-3.0	1.0-4.6	1.0-2.0	1.0-4.6
dont acide quinique	0.4	0.8	0.4	1.0
Acides chlorogéniques totaux	5.5-9.0	0.2-3.5	7.0-12.0	0.2-4.6
Oligosaccharides	6.0-8.0	0.0-3.5	5.0-7.0	0.0-3.5
dont saccharose (ou sucrose)	8.0	0.0	4.0	0.0
Polysaccharides totaux	50.0-55.0	24.0-39.0	37.0-47.0	--
Protéines	11.0-14.0	13.0-15.0	11.0-14.0	13.0-15.0
Acides aminés libres	2.0	0.0	2.0	0.0
Lipides totaux	10.0-18.0	14.5-20.0	8.0-13.0	8.3-16.0
Minéraux	3.0-4.2	3.5-4.5	3.5-4.5	4.6-5.0
dont potassium				
Eau	5-12	0-5	5-12	0-5

La teneur en eau est un paramètre important à contrôler dans le café vert car elle gouverne les réactions de fermentation et de développement de moisissures durant le stockage et le transport des grains, qui peuvent entraîner le développement d'arômes indésirables ou la formation de mycotoxines, et donc altérer la qualité du café [Reh et al. (2006)]. Il est recommandé de sécher le grain jusqu'à obtenir une teneur en eau inférieure ou égale à 12% pour minimiser ce genre de problème.

Dans un premier temps, nous présenterons les constituants des grains de café vert, selon la variété de café ou le mode de production des grains. Ensuite, compte tenu de certaines différences dans la composition du café avant et après torréfaction, nous discuterons plus en détail l'effet de l'étape de torréfaction sur la composition des grains de café, avant de discuter la composition du café boisson.

1.2.1 La composition des grains de café vert

1.2.1.1 Les alcaloïdes

1.2.1.1.1 Les xanthines (dont la caféine)

Les xanthines sont une famille d'alcaloïdes, aux effets thérapeutiques souvent utilisés (ex : stimulants, bronchodilatateurs). Leur présence dans les grains de café, et ensuite dans le café boisson, est d'une grande importance en raison de leur activité physiologique importante et multiple comme nous le verrons par la suite.

La caféine, ou 1,3,7-triméthylxanthine, est l'alcaloïde majoritaire du café (voir structure sur la **Figure 1.8**). On trouve également, mais en quantités bien plus faibles, la théobromine (ou 3,7-diméthylxanthine) et la théophylline (1,3-diméthylxanthine). D'autres xanthines sont présentes à l'état de traces dans le café vert, telles l'hypoxanthine, l'adénine et la guanine, mais celles-ci sont détruites lors de la torréfaction des grains.

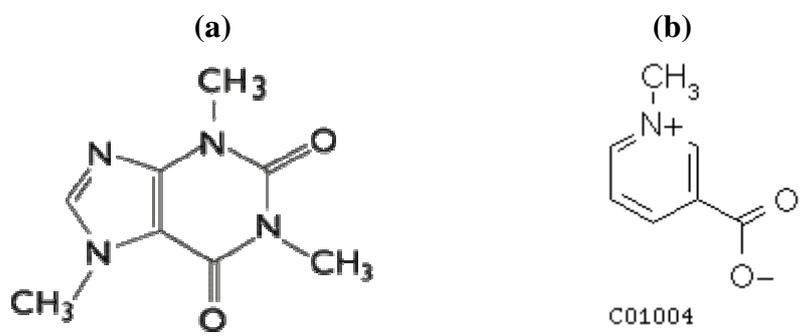


Figure 1.8 : Structures chimiques de (a) la caféine, (b) la trigonelline.

La caféine serait synthétisée à partir des purines dans les grains de café vert. Elle joue un rôle protecteur en raison de ses propriétés antifongiques, voire peut-être insecticides. La teneur en

cafféine des grains de café vert dépend en premier lieu de la variété de café : elle est sensiblement plus élevée pour le robusta (1.2 à 3.3% en masse par rapport à la matière sèche) que pour l'arabica (0.9 à 2.1%) [Martin et al. (1998); Campa et al. (2005b); Casal et al. (2005)].

1.2.1.1.2 La trigonelline

La trigonelline, ou méthylbétaine de l'acide nicotinique, est une base azotée très soluble dans l'eau (voir structure sur la **Figure 1.8**). Sa teneur est sensiblement plus élevée dans *Coffea arabica* (0.6 à 1.9% du poids en matière sèche) que dans *Coffea canephora* (0.3 à 1.9%). De même, sa concentration est sensiblement plus faible dans les grains de café vert défectueux que dans ceux de bonne qualité [Farah et al. (2006)]. Cette molécule est très importante car, au cours de la torréfaction du grain, elle va subir partiellement différentes dégradations pour donner lieu à la formation d'un certain nombre d'arômes comme nous le verrons par la suite.

1.2.1.2 Les acides

L'acidité constitue l'une des caractéristiques les plus importantes du café, au même titre que l'amertume ou l'arôme. Le pH moyen des grains de café vert est de l'ordre de 5.5 [Franca et al. (2005)]. Plusieurs types d'acides contribuent à cette acidité : aliphatiques, chlorogéniques, alicycliques et phénoliques.

• Les acides aliphatiques

Plusieurs acides aliphatiques ont été mis en évidence dans le café vert, comme indiqué dans le **Tableau 1.2** : des acides non volatils (citrique, malique, oxalique et quinique), et à l'état de traces des acides volatils (principalement acétique). Leur teneur totale est sensiblement la même pour l'arabica que pour le robusta, avec en moyenne 1.6-1.7% du poids de matière sèche. Par contre l'acide quinique libre est plus concentré dans l'arabica. Il se trouve également présent sous des formes dérivées que sont les acides chlorogéniques.

Tableau 1.2 : Répartition des acides aliphatiques dans le café vert selon la variété (pourcentage de matière sèche) [Illy et Viani (1998)].

Acides aliphatiques	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Acide formique		Traces-0.14
Acide acétique		Traces
Acide oxalique		Traces-0.2
Acide malique		0.3-0.7
Acide succinique		Traces-0.15
Acide citrique		0.5-1.5
Acide quinique	0.3-0.6	0.35
Total	1.1-3.1	0.7-3.5

• **Les acides chlorogéniques**

Les acides chlorogéniques constituent une famille d'esters formés entre certains acides transcinnamiques (caféique ou férulique) et l'acide quinique. Ils représentent environ 7-10 et 5-7.5% en masse de la matière sèche pour le robusta et l'arabica respectivement [Montavon et al. (2003)]. Le composé majoritaire reste l'acide n-chlorogénique (ou acide 5-caffeoylquinique) pour tous les cafés, puisqu'il représente 60 et 75% de l'ensemble des acides chlorogéniques dans le café robusta et arabica respectivement [Ky et al. (2001)]. Selon la variété et l'origine géographique du café vert, sa concentration peut varier entre environ 2.7 et 5.6% (en masse par rapport à la matière sèche) [Martin et al. (1998)]. D'autres acides chlorogéniques sont présents, comme indiqué dans le **Tableau 1.3**.

Tableau 1.3 : Teneurs moyennes en acides chlorogéniques selon la variété de café vert (pourcentage en masse par rapport à la matière sèche) [Ky et al. (2001)].

Acides chlorogéniques	Abréviations	Teneurs moyennes	
		<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Acide 3-caffeoylquinique	3-CQA	0.20	0.81
Acides 4- et 5-caffeoylquinique	4- et 5-CQA	3.06	6.85
Acide 5-feruloylquinique	5-FQA	0.15	1.17
Acides 3-, 4-feruloylquinique	3- et 4-FQA	0.04	0.26
Acide 3,4-dicaffeoylquinique	3,4-diCQA	0.12	0.77
Acide 3,5-dicaffeoylquinique	3,5-diCQA	0.23	0.71
Acide 4,5-dicaffeoylquinique	4,5-diCQA	0.25	0.83
Total	CGA	4.1	11.3

Les acides chlorogéniques constituent la source principale de polyphénols dans le café vert. Ces composés sont bien connus comme sujets à des réactions rédox, en particulier à des oxydations enzymatiques ou des auto-oxydations (processus intervenant spontanément en présence d'oxygène). Comme nous le verrons par la suite, l'oxydation de ces polyphénols a une grande influence sur la qualité finale du café.

Ces acides peuvent former un complexe avec la caféine dans un rapport équimolaire (chlorogénate de caféine). Ils peuvent aussi se lier à d'autres alcaloïdes, comme la théophylline, la paraxanthine ou la théobromine [Campa et al. (2005a)]. Toutefois, une part importante de ces acides reste sous forme libre. Une teneur élevée en acide 5-caffeoylquinique a pu être corrélée avec certains grains défectueux, ceux qui ne sont pas assez mûrs [Farah et al. (2006)].

1.2.1.3 Les protéines et acides aminés libres

Les acides aminés présents dans le café vert sont principalement liés aux protéines, la fraction libre ne représentant qu'environ 5% du total comme indiqué dans le **Tableau 1.4**, avec une teneur sensiblement plus élevée pour le robusta que pour l'arabica [Casal et al. (2005)]. Cette fraction libre est délicate à isoler et quantifier. Parmi les principaux acides aminés qui la composent, on trouve les acides glutamique, aspartique et γ -aminobutyrique.

Quant à la détermination de la teneur totale en acides aminés, elle passe par une hydrolyse des protéines, afin d'avoir accès à la fraction liée. Les teneurs en protéines de *Coffea arabica* et de *Coffea canephora robusta* sont comparables, et varient entre 8.7 et 13.6% de la matière sèche du grain vert. Ces protéines se composent de deux fractions en quantités comparables, l'une soluble dans l'eau, l'autre insoluble.

Tableau 1.4 : Répartition des différents acides aminés (somme des énantiomères D- et L-) dans le café vert selon la variété (en pourcentage de matière sèche) [Illy et Viani (1995); Casal et al. (2005)].

Acides aminés	Fractions libres		Totaux
	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>	
Alanine (Ala)	0.03-0.05	0.04-0.09	0.43-0.5
Arginine	0.01	0.02	0.5
Acide aspartique (Asp)	0.05	0.06-0.09	0.84-1.0
Asparagine	0.05	0.09	
Cystéine	Traces	Traces	0.3
Acide glutamique (Glu)	0.13-0.14	0.08-0.12	1.5-1.9
Glycine (Gly)	0.005-0.01	0.008-0.02	0.46-0.63
Histidine (His)	0.005-0.01	Traces-0.09	0.1-0.2
3-Méthylhistidine	Traces	Traces	
Isoleucine (Ile)	0.008-0.01	0.009-0.02	0.4
Leucine (Leu)	0.007-0.01	0.009-0.02	0.7-1.0
Acide γ-aminobutyrique (GABA)	0.04-0.05	0.007-0.10	
Lysine (Lys)	0.007-0.01	Traces-0.009	0.6-0.7
Méthionine (Met)	Traces-0.002	Traces-0.003	0.06-0.2
Phénylalanine (Phe)	0.02	0.02-0.04	0.37-0.7
Proline (Pro)	0.03	0.03-0.04	0.6-0.8
Sérine	0.03	0.04	0.5
Thréonine	Traces	0.04	0.3
Tyrosine (Tyr)	0.006-0.01	0.01-0.02	0.3-0.4
Valine (Val)	0.01-0.015	0.01-0.05	0.3-0.5
Tryptophane (Trp)	0.01	0.04-0.05	0.1
Total	≈ 0.50	≈ 0.78	≈ 10.3

Plusieurs enzymes ont également été mises en évidence dans le café vert, notamment la polyphénoloxydase, responsable de la décoloration des grains défectueux en catalysant

l'oxydation des acides chlorogéniques. Cependant ces enzymes ne représentent qu'une part faible part des protéines, et de plus elles sont détruites par la torréfaction.

1.2.1.4 Les glucides

Les glucides représentent environ 48-60% de la matière sèche du café vert. *Coffea arabica* est généralement un peu plus riche que *Coffea canephora*. Ils sont constitués de glucides solubles cytoplasmiques (monosaccharides, oligosaccharides et polysaccharides) et de glucides insolubles constitutifs des parois végétales (hémicellulose et holocellulose). Ainsi, la composition en glucides des grains de café vert, pour les deux espèces *Coffea arabica* et *Coffea canephora*, est donnée dans le **Tableau 1.5**.

Tableau 1.5 : Composition moyenne en glucides des grains de café vert [Debry (1987)].

Glucides	Fraction (% matière sèche)		Composants
	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>	
		9.2-13.5	
Solubles :			
Monosaccharides	0.2-0.5	0.2-0.5	Mannose, glucose, galactose, arabinose, fructose, mannitol, xylose, ribose
Oligosaccharides	6.0-9.0	3.0-7.0	Saccharose, raffinose, stachyose
Polysaccharides	3.0-4.0	3.0-4.4	Polymères de galactose (55-65%), mannose (10-20%), arabinose (20-35%), glucose (0-2%)
Insolubles :	46.0-53.0	34.0-44.0	
Hémicelluloses	5.0-10.0	3.0-4.0	Polymères de galactose (65-75%), arabinose (25-30%), mannose (0-10%)
Holocelluloses	41.0-43.0	32.0-40.0	Polymères de galactose (10-20%), mannose (60-70%), glucose (10-20%)
Total	55.2-66.5	41.2-55.9	

Le mannose semble être le monosaccharide majoritaire (environ 45%), suivi du galactose (25%), du glucose (17%) et de l'arabinose (10%) [Fischer et al. (2001); Oosterveld et al. (2003)]. En fait, les polysaccharides sont constitués principalement de mannanes, galactomannanes, arabinogalactanes (au total environ 80% molaire), ainsi que de cellulose et xyloglucanes (environ 16%) le restant étant constitué d'acide uronique (4%) [Oosterveld et al. (2003)]. Ce sont des précurseurs d'arômes très importants, et pour cette raison de nombreuses études se sont intéressées à la caractérisation de ces polymères dans le café vert. Ceci n'est pas chose aisée car ces polymères sont partiellement insolubles, et donc difficile à extraire. Toutefois, il semble que leur composition, et par là même leur solubilité dans l'eau, varie selon la variété de café. Il a été montré que les mannanes sont composés de chaînes de β -(1-4)-D-mannanes substituées à C-6 par des résidus de galactose (il s'agit donc en fait de galactomannanes à proprement parler, et non de simples mannanes), avec environ 1 mannose

substitué sur 20. Les arabinogalactanes possèdent un rapport arabinose/galactose de 0.4/1, et il sont constitués d'un squelette de β -galactose lié en (1-3), substitué à C-6 par des résidus de galactose et d'arabinose, ce qui est caractéristique des arabinogalactanes de type II. Ce type de polysaccharides est plus facilement extrait par l'eau chaude des grains de café vert lorsque le café est de variété robusta plutôt qu'arabica [Nunes et al. (2002)].

Une partie des arabinogalactanes du café vert est liée à des protéines (environ 15% de la matière sèche du grain). Les polymères ainsi obtenus ont des propriétés rhéologiques intéressantes, ce qui pourrait constituer une voie de valorisation des grains de café vert défectueux [Redgwell et al. (2005)].

1.2.1.5 Les lipides

Les grains de café vert de *Coffea arabica* contiennent en moyenne 12 à 20% de lipides totaux et ceux de *Coffea canephora robusta* 9 à 17% [Carrera et al. (1998)]. Les teneurs en lipides, tout comme celles des différentes fractions lipidiques, varient en fonction des méthodes d'extraction et d'analyse utilisées. Les lipides du grain sont répartis entre la couche externe entourant le grain (0.2 à 0.3% des lipides totaux : il s'agit de la cire) et l'endosperme (on parle alors d'huile de café). La méthode de référence pour extraire l'huile de café est une extraction Soxhlet à l'hexane.

Plusieurs constituants lipidiques sont présents, comme indiqué dans le **Tableau 1.6** : les triglycérides (très largement majoritaires), les acides gras libres, les esters de diterpènes, les diterpènes libres, les triterpènes, les stérols, les esters de méthylstérols, les 5-hydroxytryptamides, les tocophérols, et les phospholipides.

Tableau 1.6 : Composition moyenne en lipides des grains de café vert [d'après Debry (1987) ; Illy et Viani (1998) ; Nikolova-Damyanova et al. (1998)].

Fractions lipidiques	Fraction des lipides totaux (%)	Constituants
Triglycérides (ou triacylglycérols)	70-80	Esters de l'acide linoléique et palmitique
Acides gras libres	0.5-2.7	
Esters diterpéniques	15.0-18.5	Esters des acides linoléique et palmitique
Diterpènes libres	0.1-1.2	
Triterpènes, stérols, et esters de stérols	1.4-3.2	Cafestol, kahweol, sitostérol, sigmastérol, campestérol
5-Hydroxytryptamides et dérivés	0.3-1.0	Amides des acides arachidique, béhénique, lignocérique
Tocophérols	0.3-0.7	α , β et γ -tocophérol
Phospholipides	0.3	

On distingue généralement 2 fractions lipidiques : saponifiable et insaponifiable. Pour les séparer, l'huile extraite du café est traitée avec une solution d'hydroxyde de potassium afin de transformer les esters en sels de potassium solubles dans l'eau (fraction dite saponifiable). Les composés qui ne réagissent pas lors de la saponification (les stérols par exemple) sont récupérés grâce à un solvant apolaire comme l'hexane ou l'éthyl éther ; dans cette fraction lipidique insaponifiable on trouve des diterpènes libres ou estérifiés, et des stérols.

La fraction lipidique du café est constituée en grande partie de triglycérides (70-80%) ; ceux-ci sont analysés de préférence par chromatographie en phase liquide [Gonzalez et al. (2001)]. Une douzaine de triglycérides (ou triacylglycérols) ont pu être identifiés dans différents cafés verts, avec trois composés majoritaires représentant 58% du total : distéarolinoléine (26-37%), stéarodilinoléine (28-38%) et stéarooléolinoléine (12-15%) [Jham et al. (2001)]. D'autres triglycérides majoritaires ont été mis en évidence dans d'autres échantillons de café vert [Gonzalez et al. (2001)]. En fait, les conditions de production des grains et de stockage sont susceptibles d'influer sur la teneur en acides gras libres, par exemple en favorisant certaines réactions enzymatiques ou l'hydrolyse de certains esters. Pour cette raison, l'utilisation de l'isopropanol est recommandée lors de l'extraction des lipides des grains, afin de désactiver les enzymes et d'éviter une dégradation des lipides au cours de cette étape.

La composition en acides gras du grain est essentiellement celle de l'huile puisque la cire ne représente qu'une faible quantité. L'analyse des acides gras contenus dans l'huile de café est réalisée par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme, avec méthylation des acides gras au préalable. Dans l'huile de café les acides gras sont majoritairement constitués d'acide linoléique (C18:2) (40-45%), et d'acide palmitique (C16:0) (30-35%), suivis de l'acide oléique (C18:1) et l'acide stéarique (C18:0) (environ 6-10% pour chacun de ces deux acides), puis des acides arachidique (C14:0) et linoléique (C18:3) (0.6-3.5% chacun), et enfin des acides myristique (C14:0), palmitoléique (C16:1), eicosénoïque (20:1) et béhénique (C22:0) (moins de 1% chacun) [Nikolova-Damyanova et al. (1998); Martin et al. (2001)]. Les acides gras constitutifs de la cire sont principalement les acides saturés arachidique (C20:0), béhénique (C22:0) et lignocérique (C24:0). Ces acides sont présents, soit sous forme libre, soit sous forme estérifiée. La teneur en acides gras libres est plus faible pour l'arabica (1.0-1.5%) que pour le robusta (1.0-2.7%). Elle est généralement considérée comme étant le résultat de la dégradation des triglycérides [Nikolova-Damyanova et al. (1998)].

Les deux diterpènes caractéristiques du café sont le cafestol et le kahweol (voir structures chimiques sur la **Figure 1.9**), ce dernier étant présent uniquement à l'état de traces dans le robusta. Pour l'arabica, le rapport cafestol/kahweol peut varier entre 40/60 et 70/30 [Illy et Viani (1998)].

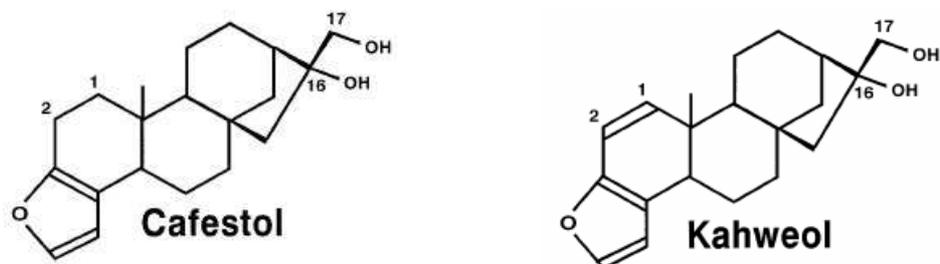


Figure 1.9 : Structures chimiques des deux diterpènes caractéristiques du café.

Plusieurs stérols sont présents dans le café vert, comme indiqué dans le **Tableau 1.7**. Les trois principaux sont le β -sitostérol (environ 45-50%), le stigmastérol (20-37%) et le campestérol (autour de 15%). On peut observer certaines différences selon la variété, avec en particulier une plus grande teneur en sitostanol pour l'arabica, alors que c'est l'inverse pour le 24-méthylènecholestérol et le Δ^5 -avenastérol. L'analyse en composantes principales a montré que le sitostanol et le Δ^5 -avenastérol sont les deux stérols permettant de différencier les cafés verts arabica et robusta [Carrera et al. (1998)]. Ce dernier stérol a d'ailleurs été proposé comme marqueur afin d'estimer les proportions relatives en arabica et robusta dans un mélange de grains de café, la torréfaction n'ayant aucun impact sur les teneurs en stérols.

Tableau 1.7 : Répartition des différents stérols dans le café vert selon la variété [Illy et Viani (1998)].

Stérols	Fraction des stérols totaux (%)	
	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Cholestérol	0.2-0.4	0.1-0.3
24-Méthylènecholestérol	0.0-0.4	1.5-2.4
Campestérol	14.7-17.0	15.5-18.8
Campestanol	0.2-0.6	0.1-0.3
Stigmastérol	20.5-23.8	20.0-26.7
Δ^7 -Campestérol	0.4-1.2	0.1-0.6
$\Delta^{5,23}$ -Stigmastadienol	0.2-0.5	0.1-2.0
Clerostérol	0.2-0.8	0.5-1.0
β -Sitostérol	46.7-53.8	40.6-50.7
Sitostanol	1.4-2.8	0.5-1.2
Δ^5-Avenastérol	1.6-4.1	5.1-14.0
$\Delta^{5,24}$ -Stigmastadienol	0.0-0.4	0.0-0.3
Δ^7 -Stigmasténol	0.9-4.5	0.1-0.8
Δ^7 -Avenastérol	1.2-2.1	0.2-0.6

Les isomères du tocophérol sont analysables par chromatographie en phase liquide [Gonzalez et al. (2001)]. Les gammes de concentration estimées dans plusieurs cafés verts (arabica ou robusta) sont les suivantes : 2-17, 9-88 et 0.9-5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (par rapport à la matière sèche) pour le α -, β - et γ -tocophérol respectivement. On peut noter que le β -tocophérol est plus concentré dans *Coffea arabica* (40-88 $\mu\text{g.g}^{-1}$) que dans *Coffea canephora* (9-16 $\mu\text{g.g}^{-1}$).

1.2.1.6 Les minéraux

Les cendres du café représentent environ 3 à 5.4% de la matière sèche. La composition moyenne en minéraux des grains verts, exprimée en pourcentage de la matière sèche, est la suivante [Debry (1987)] : potassium 1.63-2%, magnésium 0.16–0.31%, sulfates 0.13%, calcium 0.07–0.035%, phosphates 0.13–0.22%. La grande majorité (90%) des minéraux sont hydrosolubles, et donc présents dans la boisson [Viani (1986)].

La variété de café a une grande influence sur les concentrations en minéraux des grains. Ainsi, comme indiqué dans le **Tableau 1.8**, le café robusta contient davantage d'éléments minéraux que l'arabica. En outre, le mode de production des grains de café vert a également une influence. Ainsi on observe que, lorsque le dépulpage – déparchage est réalisé par voie humide, la teneur en minéraux des grains de café vert obtenus est sensiblement plus faible que par voie sèche.

Tableau 1.8 : Composition en minéraux des grains de café verts selon la variété et le mode de production (en pourcentage de la matière sèche) [Debry (1987) ; Illy et Viani (1998)].

Composants	<i>Coffea arabica</i>		<i>Coffea canephora</i>
	Méthode sèche	Méthode humide	Méthode sèche
Minéraux totaux	4.11-4.27	3.58-3.95	4.14-4.39
Potassium	1.77-1.88	1.63-1.70	1.84-2.00

Le manganèse est en quantité plus grande dans *Coffea arabica* (25-60 mg.kg^{-1} de matière sèche) que dans *Coffea canephora robusta* (10-33 mg.kg^{-1} de matière sèche). Le cuivre, présent à l'état de trace (principalement dans le parchemin), est en quantité plus élevée dans *Coffea canephora robusta* (11-33 mg.kg^{-1} de matière sèche) que dans *Coffea arabica*, ce qui, du fait des propriétés antifongiques du cuivre, pourrait éventuellement expliquer la meilleure résistance de *Coffea canephora robusta* aux développements des espèces fongiques par rapport à *Coffea arabica*.

1.2.1.7 Les vitamines

Le café vert contient plusieurs vitamines, à savoir les vitamines B1 (thiamine), B2 (riboflavine), B3 ou PP (acide nicotinique, amide nicotinique), B5 (acide panthoténique), B12 (cyanocobalamine) et C (acide ascorbique, acide folique).

1.2.1.8 Les amines

On distingue deux types d'amines dans les végétaux : (1) les polyamines (agmatine, putrescine, spermidine et spermine) formées lors de réactions de biosynthèse *de novo*, (2) les amines biogènes (cadavérine, histamine, 2-phénylethylamine, putrescine, sérotonine, tyramine et tryptamine) formées par des réactions de décarboxylation à partir d'acides aminés [Cirilo et al. (2003)]. Peu d'études se sont intéressées à l'analyse des amines dans le café. Il apparaît toutefois que dans le café vert la putrescine est majoritaire (50-75% de la teneur totale en amines), suivie par la spermidine (12-29%), la spermine (12-21%) ainsi que la sérotonine (ou 5-hydroxytryptamine) dans certains cafés (0-4%) [Amorim et al. (1977) ; Oliveira et al. (2005); Cirilo et al. (2003); Vasconcelos et al. (2007)]. Il n'est pas étonnant de retrouver ces trois amines dans le café puisqu'elles sont présentes dans beaucoup de plantes ; de plus la putrescine est un précurseur de la spermidine et spermine, ce qui explique sa teneur plus élevée. Elles sont en effet impliquées dans plusieurs processus physiologiques importants, tels que la croissance du fruit et son développement. Des traces d'histamine, de tryptamine et de cadavérine ont également été observées dans des cafés de mauvaise qualité ou des grains défectueux. Selon les études, la teneur en amines totales dans le café vert varie entre 30 et 137 mg.kg⁻¹, les variations étant imputables à différentes variétés et conditions de culture du café [Oliveira et al. (2005); Cirilo et al. (2003)].

1.2.1.9 Conclusion

Il apparaît que la composition des grains de café vert est très complexe, et qu'elle est de plus variable en fonction de divers facteurs tels que la variété de café (arabica, robusta, ou mélange des deux), l'origine géographique, ou encore le mode de production. Par conséquent, le prix de cette denrée fluctue selon la qualité finale des grains produits. Aussi est-il important de disposer d'indicateurs ou de méthodes simples permettant une discrimination des grains de café vert en fonction notamment de leur variété, et si possible de leur origine. Pour ce faire, les données analytiques peuvent être traitées par des méthodes chimiométriques. Ainsi l'analyse en composantes principales (PCA), l'analyse par *clusters* (CA) et la méthode des K plus proches voisins ont été appliquées aux teneurs en extrait aqueux, polyphénols totaux, acides aminés libres totaux, trigonelline, acide chlorogénique et caféine de différents cafés

verts [Martin et al. (1998)]. Les variétés arabica et robusta ont ainsi pu être différenciées en fonction de leurs concentrations en caféine et acides aminés libres totaux. De la même manière, les deux variétés peuvent être discriminées en utilisant comme descripteurs les teneurs en acides oléique et linoléique [Martin et al. (2001)], ou en triglycérides [Gonzalez et al. (2001)]. L'analyse en composantes principales appliquée à des spectres proche infra-rouge a également permis de distinguer les deux variétés de café vert [Huck et al. (2005)].

1.2.2 La composition des grains de café torréfiés

Comme nous l'avons déjà mentionné, la torréfaction constitue une étape clef dans la production de café. En effet, selon les conditions (principalement de température et de durée), les réactions chimiques se produisant à l'intérieur des grains seront variables. Or ces réactions sont très importantes pour le développement des caractéristiques organoleptiques du café, notamment grâce aux réactions de brunissement non-enzymatique (également appelées « réaction de Maillard ») impliquant des sucres réducteurs et des acides aminés. Parallèlement d'autres réactions chimiques se produisent, entraînant une composition du café torréfié sensiblement différente de celle du café vert initial.

1.2.2.1 Les alcaloïdes (caféine et trigonelline)

La torréfaction n'a pas d'effet significatif sur la teneur en caféine des grains de café [Franca et al. (2005)]. A l'inverse, au cours de la torréfaction la trigonelline se décompose en acide nicotinique (vitamine PP ou niacine), en pyridine et en substances aromatiques (tels que les furanes, pyrazines, alkylpyridines ou les pyrroles) ; en outre vers 250°C il se forme certains composés ayant une activité mutagène [Wu et al. (1997)]. Ainsi, on constate que la dégradation de la trigonelline augmente avec la température de torréfaction : à 200°C la perte est de 80%, et à 240°C il ne reste que 5-15% de trigonelline après la torréfaction [Franca et al. (2005); Casal et al. (2000)]. Au final, le café torréfié contient entre 0.2 et 1.7% de trigonelline, et ce composé contribue à l'amertume du café. Le rapport trigonelline / acide nicotinique peut constituer une méthode d'évaluation du degré de torréfaction du café [Illy et Viani (1998)].

Pour analyser les alcaloïdes dans le café torréfié, une extraction par solvant (éventuellement sous reflux) est souvent réalisée, suivie d'une analyse de l'extrait par chromatographie en phase liquide couplée, soit à la spectrophotométrie UV-Visible, soit à la spectrométrie de masse. C'est ainsi que la caféine, la théophylline et la théobromine ont pu être quantifiées. Une méthode d'analyse globale, telle que la spectroscopie proche infra-rouge peut également

être mise en œuvre, en exploitant les spectres obtenus par des méthodes chimiométriques comme la régression aux moindres carrés partiels (PLS) [Huck et al. (2005)].

1.2.2.2 Les acides

L'acidité du grain diminue au cours de la torréfaction, avec un pH moyen proche de 6, voire 6.5 pour un café de mauvaise qualité [Franca et al. (2005)]. Les différents acides (aliphatiques, chlorogéniques, alicycliques et phénoliques) constituent environ 6% en masse du grain.

• Les acides aliphatiques

Plusieurs acides organiques ont récemment été déterminés dans des extraits aqueux de cafés torréfiés ou lyophilisés par électrophorèse capillaire : acides oxalique, formique, fumarique, mésaconique, succinique, maléique, malique, isocitrique, citrique, acétique, citraconique, glycolique, propionique, lactique, furanoïque, pyroglutamique et quinique [Galli et Barbas, (2004)]. Différents profils d'acides ont pu être observés en fonction du mode de production du café comme indiqué dans le **Tableau 1.9**.

Tableau 1.9 : Concentrations estimées en acides aliphatiques dans deux types de café ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) [Galli et Barbas, (2004)].

Acides aliphatiques	Café torréfié (Colombie)	Café lyophilisé (Colombie)
Acide formique	2.7 ± 0.2	8.1 ± 0.2
Acide acétique	7.3 ± 0.3	14.4 ± 0.5
Acide oxalique	0.256 ± 0.005	0.17 ± 0.01
Acide malique	2.2 ± 0.1	5.7 ± 0.3
Acide succinique	0.18 ± 0.02	0.80 ± 0.07
Acide citrique	10.1 ± 0.3	14.4 ± 0.9
Acide quinique	9.4 ± 0.5	44 ± 2
Acide fumarique	0.206 ± 0.008	1.14 ± 0.03
Acide mésaconique	0.077 ± 0.002	0.41 ± 0.01
Acide maléique	0.102 ± 0.009	0.46 ± 0.04
Acide isocitrique	1.3 ± 0.1	18.3 ± 0.9
Acide citraconique	0.26 ± 0.02	0.82 ± 0.07
Acide glycolique	1.69 ± 0.06	4.0 ± 0.3
Acide propionique	0.06 ± 0.02	Non détecté
Acide lactique	0.72 ± 0.08	2.1 ± 0.3
Acide furanoïque	0.15 ± 0.01	0.50 ± 0.01
Acide pyroglutamique	0.85 ± 0.05	8.8 ± 0.4

On peut noter la présence d'acide pyroglutamique (un acide aminé libre naturellement présent dans les végétaux), avec une concentration plus élevée dans le café instantané.

• Les acides chlorogéniques

Au cours de la torréfaction, l'acide n-chlorogénique se dégrade pour donner lieu à différents dérivés du phénol, comme indiqué sur la **Figure 1.10**, en particulier l'acide caféique, l'acide quinique, le catéchol, le pyrogallol et l'hydroquinone. Ces composés contribuent à l'amertume du café.

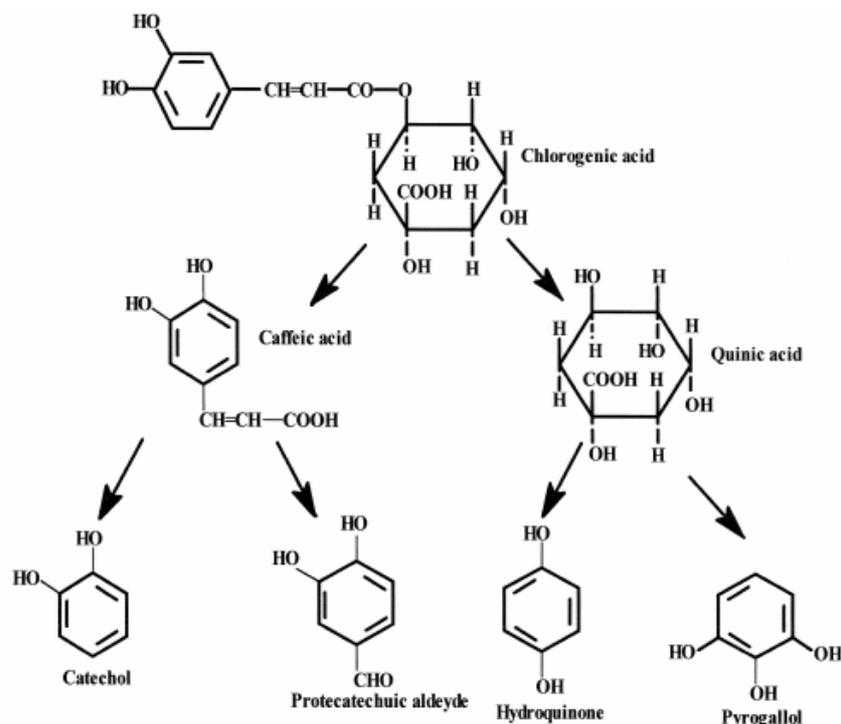


Figure 1.10 : Voies de décomposition de l'acide chlorogénique lors de la torréfaction du grain de café [Duarte et al. (1999)].

A 200°C il a été observé environ 95% de perte en acide n-chlorogénique contenu dans des cafés arabica brésiliens [Franca et al. (2005a); Farah et al. (2006) ; Franca et al. (2005b)]. Les teneurs des produits de pyrolyse de l'acide chlorogénique, notamment celles des acides quinique et caféique, dépendent de la variété de café et du degré de torréfaction. La formation de la quinide (lactone de l'acide quinique) a également été observée, proportionnellement à la quantité d'acide quinique initiale.

1.2.2.3 Les protéines et acides aminés

Sous l'effet de la torréfaction, et en fonction de son intensité, la perte en acides aminés varie de 20 à 40% du fait de la destruction d'une partie des protéines. Les proportions respectives des acides aminés sont modifiées en raison de la plus grande thermorésistance de certains d'entre eux tels que l'alanine, la tyrosine, la leucine, la phénylalanine et la valine. D'autres sont thermosensibles comme l'arginine, la cystéine, la serine, la thréonine, la lysine, la méthionine et l'histidine. Les fractions libres sont également dégradées, plus ou moins

rapidement selon les composés. De plus, sous l'effet de la torréfaction, une partie des acides aminés se racémise (fractions libre et liée), pour donner les énantiomères D- (certains de ces énantiomères pouvant avoir des effets toxiques), et ce d'autant plus que la température de torréfaction est élevée [Casal et al. (2005)]. Ainsi pour l'arabica, le taux de racémisation augmente brutalement à partir de 150-160°C, température qui correspond au début réel de la phase dite de torréfaction où les réactions deviennent exothermiques.

La réaction de Maillard, comporte deux grandes étapes : (1) la synthèse de composés carbonylés très réactifs (tels que les furfurals), (2) la formation de polymères bruns (mélanoïdines) et de composés très volatils et odorants. Elle a lieu initialement par l'addition nucléophile d'une fonction amine libre (acide aminé, protéine, peptide) sur une fonction carbonylée d'un sucre réducteur (ou autre composé à fonction carbonyle libre) pour donner, après isomérisation, une base de Schiff et un produit d'Amadori (voir **Figure 1.11**).

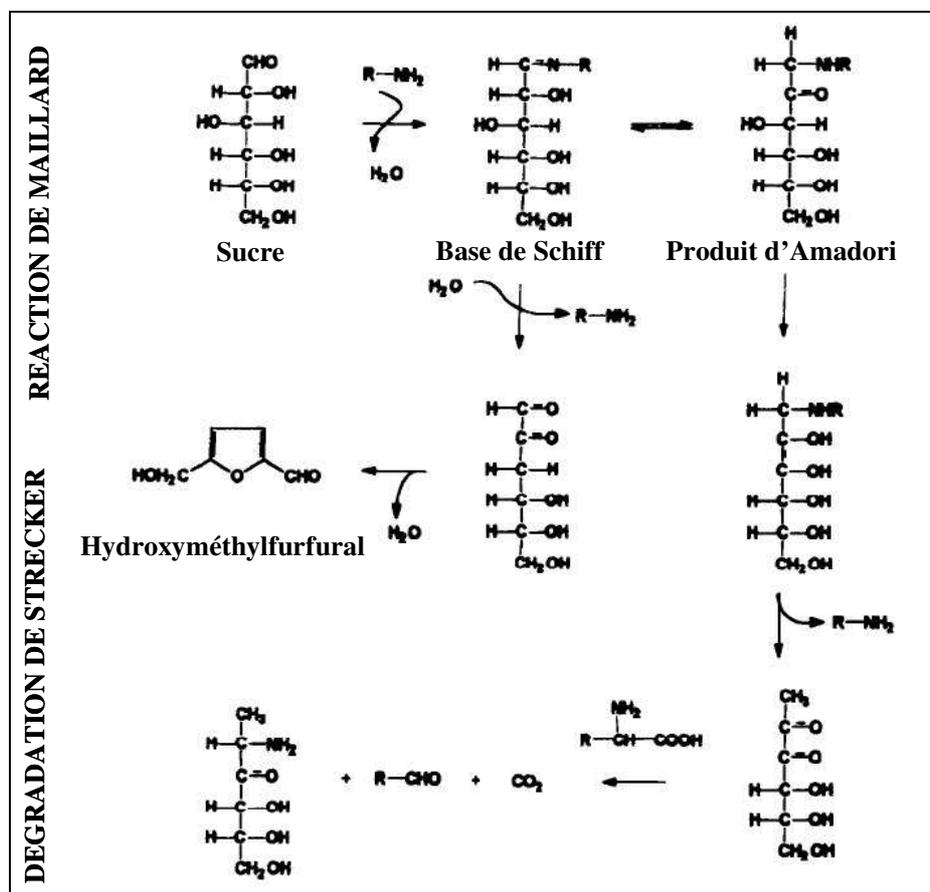


Figure 1.11 : Représentation des réactions chimiques se produisant lors de la torréfaction (réaction de Maillard et dégradation de Strecker) [Martin et al. (1996)].

La base de Schiff peut ensuite se déaminer et se cycliser pour donner l'hydroxyméthylfurfural (HMF). Le produit d'Amadori peut quant à lui conduire à divers composés à hautes températures. Par déshydratation modérée, on obtient des substances réductrices telles les

réductones et les déshydroréductones qui réagissent avec les acides aminés selon la réaction de Strecker (dégradation de Strecker), pour donner des aminocétones. La condensation des aminocétones donne des pyrazines, substances aromatiques très réactives présentes dans les produits alimentaires auxquels elles donnent des arômes particuliers plus ou moins désirables. Ces réductones donnent également des composés très colorés [Bailey et al. (2000)].

La polymérisation des composés issus de la condensation aldolique de composés azotés, conduit à des pigments bruns ou noirs insolubles, de poids moléculaire élevé ; il s'agit des mélanoidines [Hofmann (1998)] qui donnent la couleur brune caractéristique de certains aliments (tel que café et chocolat torréfiés, croûte du pain, couleur dorée de la bière). Par contre la scission des composés obtenus par condensation aldolique, donne des produits volatils et odorants.

Si nombre des produits de la réaction de Maillard confèrent au café torréfié sa couleur et ses qualités organoleptiques, d'autres en revanche doivent être évités en raison de leur toxicité. Ainsi, la dégradation des acides aminés vers 250°C peut conduire à la formation de composés ayant une activité mutagène [Wu et al. (1997)].

1.2.2.4 Les glucides

La torréfaction altère et dégrade les glucides présents initialement dans le café vert, notamment en induisant des réactions de dépolymérisation, de modifications structurales, ou de condensation avec des protéines ou des fragments de protéines. Ainsi, à partir des glycoprotéines, des glucides solubles et de l'holocellulose des grains verts, des monosaccharides sont libérés (galactose, mannose, arabinose, ribose). Le saccharose (ou sucrose) est dégradé à 97 –100% selon le degré de torréfaction [Vasconcelos et al. (2007)]. Réagissant avec les acides aminés (libres ou liés), les monosaccharides (glucose, fructose, arabinose, galactose) forment des polymères bruns (dont les mélanoidines) et des substances aromatiques via la réaction de Maillard ; des produits de pyrolyse se forment également. Il s'ensuit une diminution de la quantité totale en glucides pouvant atteindre 20-37% selon le degré de torréfaction, si l'on prend en compte la perte en matière sèche observée (environ 8%) [Oosterveld et al. (2003)]. Le devenir des polysaccharides au cours de la torréfaction est illustré par la **Figure 1.12**.

Des réactions d'hydrolyse entraînent une meilleure solubilisation des polysaccharides dans un premier temps, puis des oligosaccharides sont formés, eux-mêmes transformés ensuite en monosaccharides, puis en produits de dégradation. Toutefois, dans le même temps, une linéarisation de certains polysaccharides (arabinogalactanes et galactomannanes) diminue leur

solubilité. Si certains glucides sont communs aux cafés verts et torréfiés, d'autres diffèrent sensiblement comme indiqué dans le **Tableau 1.10** suivant.

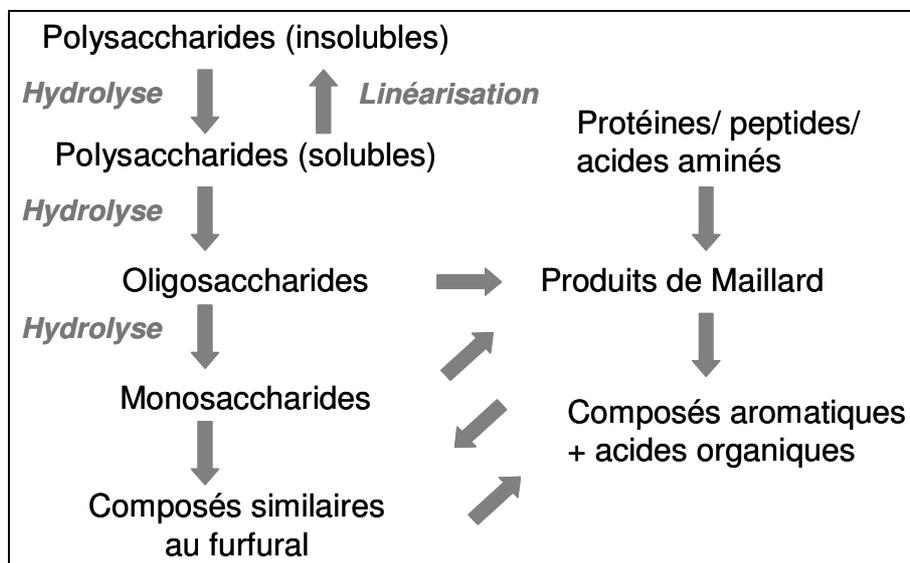


Figure 1.12 : Représentation schématique du devenir des polysaccharides du café au cours de la torréfaction du grain [Oosterveld et al. (2003)].

Tableau 1.10 : Glucides du café vert et du café torréfié [Debry (1987)].

Glucides communs aux cafés verts et torréfiés	Arabane, L-arabinose, cellobiose, cellulose, galactane, D-glucose, acide glucuronique, maltose, D-mannane, D-mannose, raffinose, rhamnose, saccharose, stachyose, xylose, acide quininique
Glucides du café vert absents du café torréfié	Arabinogalactane, acide D-galacturonique, glucogalactomannane, melibiose, amidon, lignine, pectine
Glucides du café torréfié absents du café vert	Fructose, D-galactose, glucane, ribose

Comme pour le café vert, la caractérisation des glucides, tout particulièrement des polysaccharides, du café torréfié est délicate. La composition de la fraction isolée d'un extrait à l'eau chaude (90°C) de grains fortement torréfiés a permis de mettre en évidence deux polysaccharides : un « mannane » et un arabinogalactane, en proportions 80 et 20% molaire respectivement [Navarini et al. (1999)]. Le « mannane » est en réalité un arabinogalactomannane, puisqu'il est constitué d'un squelette de β -(1-4)-D-mannane substitué avec des petites quantités de galactose et d'arabinose. En ce qui concerne l'arabinogalactane, son squelette carboné est constitué d'unités β -(1-3)-D-galactopyranoses, substituées pour certaines soit par des β -D-galactoses terminaux, soit par des α -L-arabinofuranoses terminaux, principalement en position C-6, et le rapport molaire arabinose/galactose est estimé à environ 0.20-0.27 (alors qu'il est de l'ordre de 0.72 pour le café vert) [Oosterveld et al. (2003)]. Ces

résultats montrent que la torréfaction entraîne une linéarisation des arabinogalactanes. De plus on constate qu'il y a en réalité deux groupes d'arabinogalactanes dans le café : l'un de poids moléculaire élevé avec une faible substitution en arabinose, et l'un de faible poids moléculaire avec une plus grande substitution en arabinose [Oosterveld et al. (2003)].

Il apparaît qu'au cours de la torréfaction la composition en polysaccharides du café se modifie, avec un taux de ramification des arabinogalactanes et galactomannanes qui diminue par rapport au café vert [Nunes et al. (2002a) et (2002b)], et une meilleure solubilisation dans l'eau des galactomannanes [Oosterveld et al. (2003)]. Une dégradation partielle des arabinogalactanes, des pectines, des galactomannanes et des xyloglucanes est aussi observée. De plus, on constate que le glucose et le mannose sont les sucres les plus stables, alors que le galactose et surtout l'arabinose sont fortement dégradés par la torréfaction (environ 50% de perte pour le galactose, et jusqu'à 66% pour l'arabinose dans le café très torréfié) [Oosterveld et al. (2003)]. Il s'ensuit une augmentation des rapports galactose/arabinose et mannose/galactose au fur et à mesure de la torréfaction.

1.2.2.5 Les lipides

Le café torréfié a une teneur élevée en lipides : environ 16% (pourcentage en masse) pour l'arabica et 11% pour le robusta.

Dans la fraction saponifiable on retrouve la même composition en acides gras libres ou liés que pour le café vert, à savoir majoritairement des acides linoléique (C18:2) (40-45%) et palmitique (C16:0) (30-35%), puis des acides oléique (C18:1) et stéarique (C18:0) (environ 6-10% pour chacun de ces deux acides), suivis des acides arachidique (C14:0) et linoléique (C18:3) (0.6-3.5% chacun), et enfin des acides myristique (C14:0), palmitoléique (C16:1), eicosénoïque (20:1) et béhénique (C22:0) (moins de 1% chacun) [Martin et al. (2001)]. La torréfaction n'a donc aucun effet sur les acides gras du café.

La fraction insaponifiable est riche en diterpènes libres mais surtout estérifiés : famille des kauranes, cafestol et kahweol. Le cafestol et le kahweol sont deux diterpènes spécifiques du café, généralement liés aux triglycérides. Ils constituent environ 10-15% de la fraction lipidique des grains de café torréfiés [Ratnayake et al. (1993)]. La quantité en cafestol et kahweol diminue au cours de la torréfaction des grains, avec environ 15% de pertes observées [Araujo et Sandi, (2007)] ; ils libèrent leurs dérivés déshydratés les plus volatils.

En ce qui concerne les stérols, la torréfaction est sans effet sur eux. Leur teneur dans le café torréfié peut donc servir à déterminer les proportions de *Coffea arabica* et de *Coffea canephora robusta* dans un mélange de café donné [Viani (1993) ; Ogawa et al. (1989) ;

Saltor et al. (1989)]. Par contre, la torréfaction entraîne une augmentation des teneurs en tocophérols dans le café (en particulier du γ -tocophérol), vraisemblablement due à une libération des isomères présents initialement sous forme liée [Gonzalez et al. (2001)].

1.2.2.6 Les minéraux

Les teneurs en plusieurs éléments minéraux ont été déterminées dans différents cafés, après une étape de minéralisation suivie d'une analyse par spectrométrie d'émission atomique avec torche à plasma [Martin et al. (1999)]. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 1.11**.

Tableau 1.11 : Teneurs en éléments majeurs et mineurs dans divers types de cafés [Martin et al. (1999); Dos Santos et al. (2001); Krejcova et Cernohorsky, (2003)].

Eléments	Cafés torréfiés		Cafés instantanés
	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>	Cafés instantanés
Majeurs	Teneurs (% en masse par rapport à la matière sèche)		
K	1.27-1.49	1.39-1.54	3.25-4.76
Mg	0.173-0.194	0.146-0.182	0.212-0.415
Na	0.0011-0.0033	0.0007-0.0033	0.029-0.666
P	0.124-0.144	0.158-0.196	0.223-0.410
Ca	0.088-0.011	0.087-0.013	0.106-0.189
Mineurs	Teneurs (mg.kg⁻¹ de matière sèche)		
Zn	5-37	5-32	3-15
Mn	13-45	12-20	4-39
Fe	40-60	50-73	14-451
Cu	11-18	13-17	0.5-2.3
Sr	1-8	4-8	Non déterminé
Ba	3-10	1-8	Non déterminé
S	Non déterminé	Non déterminé	0.148-0.206
Al	Non déterminé	Non déterminé	Non détecté – 233
Sn	Non déterminé	Non déterminé	6.4-11.6
Cr	Non déterminé	Non déterminé	Non détecté – 0.5
B	7-18	7-18	13-21

Les éléments majoritaires sont en premier lieu le potassium, suivi du magnésium et du phosphore. L'analyse en composantes principales appliquée à ces données a permis de montrer que le phosphore, le cuivre et le manganèse sont les éléments les plus discriminants pour différencier le café selon sa variété. Leur détermination permet de prédire la composition en arabica et robusta de différents mélanges. Une autre étude a montré que le potassium et le magnésium sont également de bons descripteurs chimiques pour différencier des cafés torréfiés de cafés instantanés, ainsi que le zinc [Fernandes et al. (2005)].

1.2.2.7 Les vitamines

Les vitamines B1 et C sont détruites lors de la torréfaction, contrairement à la vitamine B3 (ou PP) qui augmente du fait de la dégradation de la trigonelline.

1.2.2.8 Les amines

Les rares études menées sur les amines dans le café ont montré que celles-ci sont en grande majorité dégradées au cours de la torréfaction, vraisemblablement au cours de la première phase (celle du séchage du grain) [Oliveira et al. (2005)]. La putrescine et la spermine sont rapidement et quasi-totalement dégradées, tandis que la spermidine et la sérotonine possèdent une vitesse de dégradation plus lente [Oliveira et al. (2005); Cirilo et al. (2003)]. Toutefois pour des torréfactions prolongées on peut observer la formation de certaines amines, par décarboxylation des acides aminés correspondant ; ainsi l'agmatine peut se former à partir d'arginine [Cirilo et al. (2003)]. De plus, des traces de cadavérine et tryptamine ont été détectées dans des cafés torréfiés de mauvaise qualité [Oliveira et al. (2005)].

1.2.2.9 Les substances volatiles

Les substances volatiles, absentes du café vert, représentent environ 0.1% de la matière sèche du café torréfié. Leur formation au cours de la torréfaction est en grande partie liée à la réaction de Maillard. Ces composés volatils sont nombreux, avec des groupements fonctionnels divers. Leur quantification est délicate, d'une part car la nature des composés extraits dépend fortement des conditions d'extraction (technique, solvant), et d'autre part car des pertes se produisent généralement à certaines étapes clés de la procédure analytique, notamment durant les phases de concentration des extraits [Sarrazin et al. (2000)]. Pour éviter ces étapes délicates, depuis quelques années les composés volatils du café sont généralement déterminés par une extraction dans l'espace de tête, telle que la microextraction en phase solide en mode espace de tête (HS-SPME), suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse. Plus d'une quarantaine de molécules ont pu être identifiées par cette technique, notamment des aldéhydes, cétones, furanes, pyrazines et phénols comme indiqué dans l'**annexe 1** [Ryan et al. (2004) ; Zambonin et al. (2005); Akiyama et al. (2003) ; Bicchi et al. (1997)]. D'autres composés volatils ont également été reportés dans d'autres études, avec au total 700 à 800 molécules présentes dans l'arôme si caractéristique du café. Plusieurs de ces substances sont des molécules hétérocycliques : furanes, pyrroles, thiophènes, pyrazines, pyridines. La présence de furanes dans le café torréfié est due en partie à la dégradation du sucrose (*via* la réaction de Maillard), l'autre partie pouvant provenir de la pyrolyse des arabinogalactanes [De Maria et al. (1996)]. Les pyrazines quant à elles peuvent

être issues de la pyrolyse d'acides aminés hydroxylés, telles que la sérine et la thréonine, de même que les pyrroles [De Maria et al. (1996)]. Enfin, les pyridines proviennent, soit de la dégradation de la trigonelline lors de la torréfaction, soit de la pyrolyse de protéines.

Lors de la mouture des grains de café, des arômes sont relargués, et ceux-ci ont pu être piégés sur une fibre SPME en polydiméthylsiloxane/divinylbenzène avant d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée soit à la spectrométrie de masse, soit à l'olfactométrie [Akiyama et al. (2003)]. Au total, 47 molécules ont pu être identifiées. Parmi elles on retrouve des arômes caractéristiques du café, tels la 4-hydroxy-2,5-diméthyl-3(2*H*)-furanone, le 2-méthoxyphénol, le 4-éthényl-2-méthoxyphénol et la 2-éthyl-3,5-diméthylpyrazine. Certaines de ces molécules aromatiques sont des composants du caramel, comme par exemple la 4-hydroxy-2,5-diméthyl-3(2*H*)-furanone (ou furaneol) détectée à des concentrations entre 25 et 50 mg.kg⁻¹ ; cette molécule serait formée à partir des sucres et des acides aminés, *via* la réaction de Maillard [Hiramoto et al. (1998)].

Grâce à un système de *purge-and-trap*, des composés volatils soufrés ont également pu être déterminés dans des échantillons de café torréfiés. Le diméthylsulfure est le composé majoritaire (218 ng S.g⁻¹), suivi du sulfure de carbone (35.0 ng S.g⁻¹), du thiophène (11.2 ng S.g⁻¹), du diméthylsulfure (18.2 ng S.g⁻¹), et de l'éthanethiol (3.3 ng S.g⁻¹) [Gerbersman et al. (1995)].

Compte tenu du grand nombre de substances volatiles, il est très difficile de mettre en évidence un ou des marqueurs spécifiques de la variété ou de l'origine du café. Cependant, il semble que la variété *Coffea arabica* se caractérise par des concentrations plus élevées en 1-(1*H*-pyrrole-2-yl)-éthanone que *Coffea canephora*, ainsi que des teneurs environ 1.5 fois plus élevées en méthylpyrazines [Hashim et Chaveron, (1996)]. De plus, le traitement des données par des techniques multivariées (en l'occurrence l'analyse en composantes principales) a mis en évidence une discrimination entre les arabicas et les robustas grâce à certains descripteurs chimiques, dont des furanes et pyrazines [Zambonin et al. (2005)]. Ainsi la pyridine, la méthyl-éthyl-pyrazine et le méthyl-2-pyrrole-carboxaldéhyde caractérisent les cafés robusta, alors que pour les cafés arabica ce sont l'acétyl pyrrole, la 1-(acétyloxy)-2-propanone et le 2-furanméthanol [Costa Freitas et al. (2001)]. Cependant les conditions de torréfaction (durée et température) influent grandement sur la nature et les concentrations respectives en substances volatiles formées. Ainsi la concentration des méthylpyrazines augmente avec la température jusqu'à atteindre un maximum de formation à 205°C pour une durée de torréfaction de 10 min [Hashim et Chaveron, (1996)]. La même tendance est observée avec la durée de torréfaction, avec un maximum à 10 min pour une torréfaction à 185°C. Les pyrazines les plus abondantes

sont la 2-méthyl-, la 2,5-diméthyl- et la 2,6-diméthylpyrazine, et les rapports 2-méthyl / 2,5-diméthyl et 2-méthyl / 2,6-diméthyl peuvent être utilisés comme indicateurs pour suivre le degré de torréfaction. En effet, un café trop torréfié conduit à une proportion élevée de 2-méthylpyrazine, alors qu'à l'inverse un café insuffisamment torréfié contient peu de cette molécule.

1.2.2.1. Conclusion

Comme pour le café vert, la composition (et donc la qualité) des grains de café torréfiés est très variable. Certains descripteurs chimiques permettent toutefois de différencier les cafés torréfiés selon leur variété, notamment la caféine puisque cette molécule est peu affectée par l'étape de torréfaction et qu'elle est présente en teneurs sensiblement plus élevées dans le café vert robusta que dans l'arabica [Esteban-Diez et al. (2004)]. L'application aux profils en composés volatils de méthodes de traitement des données multivariées, telle l'analyse en composante principale (PCA), a permis de discriminer des cafés selon leur variété (arabica, robusta, mélanges des deux), et selon leur origine géographique (des cafés arabica ont pu être discriminés selon leur origine : Amérique du sud ou Amérique centrale) [Bicchi et al. (1997) ; Zambonin et al. (2005)]. Les tocophérols apparaissent également comme des marqueurs intéressants pour distinguer les cafés torréfiés des cafés verts [Gonzalez et al. (2001)]. D'autres descripteurs permettent de discriminer les cafés torréfiés avec ajout de sucre, principalement l'hydroxyméthylfurfural et le magnésium [Martin et al. (1996)]. La mise en œuvre d'approches spectrales globales telles que la spectrométrie proche infra-rouge, éventuellement couplées à des méthodes chimiométriques (ex : PCA et analyse discriminante (DA)), apparaît comme une alternative séduisante et rapide de différenciation des cafés torréfiés, soit en fonction de leur variété, soit en fonction du degré de torréfaction [Kemsley et al. (1995); Esteban-Diez et al. (2004a) et (2004b); Esteban-Diez et al. (2006)].

1.2.3 La composition du café boisson

Le café boisson peut être préparé de différentes façons comme déjà mentionné, et à partir soit d'une variété donnée (arabica ou robusta), soit d'un mélange des deux variétés (et dans ce cas les proportions d'arabica et de robusta peuvent varier selon les mélanges). De fait, la composition du café boisson peut varier en fonction de ces conditions de préparation.

1.2.3.1 Les alcaloïdes (principalement la caféine)

La caféine reste très majoritaire dans le café boisson, avec un facteur caféine/théobromine pouvant atteindre 1000/1 pour certains cafés [Lopez-Martinez et al. (2003)]. Plusieurs paramètres influent sur la concentration en caféine du café boisson : la variété de café, son

origine géographique, la quantité de café employée, le mode de préparation choisi, le volume de café boisson préparé ou encore la durée de préparation [Bell et al. (1996)]. De fait, la teneur en caféine du café boisson peut varier entre 70 et 150 mg par tasse. Plus la mouture est fine, plus la quantité de caféine extraite est élevée grâce à une surface de contact café-eau plus importante. La teneur en caféine du café boisson augmente également avec la durée de préparation (ce qui est classique en terme d'extraction) ou le volume de café préparé. Enfin, un rapport café moulu / volume d'eau élevé entraîne une boisson très caféinée, avec en moyenne 17-18 mg de caféine extraite par gramme de café moulu pour le café filtre [Bell et al. (1996)]. La teneur en caféine du café bouilli est sensiblement similaire à celle du café filtre, ce qui montre que ce n'est pas la caféine qui est responsable de l'augmentation du taux de cholestérol sanguin associée à une consommation de café bouilli comme nous le verrons par la suite.

La caféine est d'une grande importance dans le café, en raison de ses propriétés physiologiques et de son caractère amer. Elle est absorbée très rapidement et complètement après son ingestion. Son excrétion est très variable d'un individu à l'autre, mais elle est diminuée chez les femmes enceintes, et elle reste faible chez le nouveau-né et le fœtus. De plus certains médicaments ou une insuffisance hépatique grave peuvent conduire à une mauvaise élimination de la caféine dans l'organisme.

1.2.3.2 Les acides

L'acidité est un facteur important des qualités organoleptiques du café infusé. Ainsi, la qualité du café est en partie fonction des proportions respectives des acides mono- et dichlorogéniques. La valeur du rapport entre ces deux acides est un peu plus basse dans le robusta que dans l'arabica. L'excès d'acides dichlorogéniques peut être responsable de la saveur métallique rémanente éventuelle de la boisson [Viani (1986)].

La saveur aigre du café maintenu longtemps à la chaleur est due, d'une part à l'augmentation de ses teneurs en acides libres (notamment de l'acide quinique) ainsi qu'à celles des lactones, et d'autre part à la diminution de sa concentration en pyridine [Engelhardt (1985) ; Van Der Stegen et al. (1988)].

1.2.3.3 Les glucides

Selon le mode de préparation de la boisson, une part plus ou moins importante des polysaccharides contenus dans le café peut être extraite et se retrouver dans le café boisson. Ces composés jouent un rôle important, à la fois sur la rétention des substances volatiles, et sur la viscosité de la boisson obtenue (sensation plus ou moins crémeuse perçue en bouche,

également appelée *corps*). En particulier dans le cas du café expresso, la stabilité de la mousse obtenue est liée à la présence de certains polysaccharides (ceux qui précipitent dans des solutions éthanoliques à 50%) [Nunes et al. (2002)]. Les galactomannanes constituent environ 70% des polysaccharides du café boisson ; les autres principaux polysaccharides sont les arabinogalactanes de type II [Nunes et al. (2005)].

1.2.3.4 Les diterpènes, cafestol et kahweol

En ce qui concerne les deux diterpènes, cafestol et kahweol, le mode de préparation du café boisson a une grande influence sur leurs concentrations finales. Les teneurs en diterpènes sont les plus élevées pour le café bouilli et le café *turc*, tandis qu'elles sont plus faibles pour le café *expresso*, et négligeables pour le café instantané et le café filtre [Urgert et al. (1995)]. Ainsi des concentrations allant jusqu'à 90 et 17 mg.L⁻¹ ont été trouvées dans le café *turc* et le café *expresso* respectivement comme indiqué dans le **Tableau 1.12**, avec un rapport cafestol/kahweol proche de 50/50 [Gross et al. (1997)]. Plus le système de préparation de la boisson permet de retenir les fines particules, plus les teneurs en cafestol et kahweol sont faibles, car ces particules s'avèrent être des sources importantes de diterpènes. De plus, le papier filtre présente l'avantage de retenir fortement la fraction lipidique, tandis que pour le café instantané une grande part des diterpènes est perdue lors du procédé industriel de fabrication du café.

Tableau 1.12 : Teneurs en cafestol et kahweol de différents cafés boissons [Gross et al. (1997)].

Type de boisson	Force du café (mg.mL ⁻¹)	Concentration en diterpènes libres (mg.L ⁻¹) ± SD		Proportion cafestol / kahweol
		Cafestol	Kahweol	
Café <i>turc</i>	83	88.7 ± 4.0	89.9 ± 4.1	49.7 / 53.3
Café bouilli	60	48.3 ± 3.8	48 ± 2.5	50.2 / 49.8
Café <i>napolitain</i>	67	37.5 ± 1.3	38.5 ± 0.9	49.3 / 50.7
Café <i>expresso</i>	154	17.3 ± 1.5	16.3 ± 1.4	51.5 / 48.5
Café filtre	65	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.03	46.2 / 53.8
Café instantané	12	1.9 ± 0.05	1.9 ± 0.01	50.0 / 50.0

La procédure analytique de détermination de ces deux composés est délicate, ce qui peut entraîner un problème de justesse des concentrations estimées. En effet, ils sont présents majoritairement sous forme estérifiée dans le café boisson. Il est donc nécessaire d'extraire dans un premier temps les diterpènes estérifiés, avant de les saponifier pour obtenir les diterpènes libres, puis de purifier le mélange obtenu avant son analyse par chromatographie

en phase liquide (HPLC) [Gross et al. (1997)]. Les rendements de chacune de ces étapes doivent donc être évalués.

La présence de ces deux diterpènes caractéristiques du café joue un rôle important comme nous allons le voir par la suite, en raison des effets physiologiques de ces deux molécules puisque celles-ci possèdent à la fois des effets hypercholestérolémiant et anticancérigènes. Ainsi, une étude récente a montré que ces deux diterpènes ne présentent aucun effet mutagène, même à des concentrations testées élevées [Majer et al. (2005)].

1.2.3.5 Les substances volatiles

De nombreux composés volatils ont été identifiés dans le café boisson (cf **Tableau 1.13**). Il semble que certains de ces composés soient retenus dans le café boisson grâce à des interactions (probablement hydrophobes) avec les mélanoïdines (non-volatiles) [Andriot et al. (2004)].

Tableau 1.13 : Les composés volatils extraits du café boisson (café turc) par SPME en immersion directe [Bicchi et al. (1997)].

Familles	Composés
Furanes	2-Furanméthanol
Pyrazines	
Pyridines	Pyridine Hydroxypyridine
Pyrroles	3-Ethyl-4-méthylpyrrole 2-Formyl-1-méthylpyrrole 1 <i>H</i> -Pyrrole-2-carboxaldéhyde
Aldéhydes	5-Méthyl-2-furancarboxaldéhyde
Cétones	1-Hydroxy-2-propanone Dihydro-2(3 <i>H</i>)-furanone 2-Hydroxy-3-méthyl-2-cyclopenten-1-one 3-Hydroxy-2-méthyl-4 <i>H</i> -pyran-4-one
Phénols	Phénol
Composés soufrés	
Divers	2-Furan-méthanol acétate Acide acétique

1.2.3.6 Conclusion

Comme pour le café torréfié et le café vert, la composition du café boisson est très variable, et ce d'autant plus qu'elle dépend, outre la variété et la qualité du café utilisé, du mode de préparation mis en œuvre. L'application aux profils en composés volatils de méthodes de traitement des données multivariées, telle l'analyse en composante principale (PCA), a permis de discriminer des cafés arabica selon leur origine géographique (Kenya, Colombie et Guatemala), et des cafés brésiliens selon le producteur [Bicchi et al. (1997)]. L'application de

techniques d'analyse globales, comme la spectrométrie proche infra-rouge, est également possible pour différencier les cafés boissons en fonction de leur qualité sensorielle [Esteban-Diez et al. (2004)].

1.2.4 Conclusion sur la composition du café

La composition du café en grains est très complexe, et en outre fortement affectée par plusieurs facteurs : la variété du café, le mode de production des grains de café vert, les conditions de torréfaction. En particulier la torréfaction modifie fortement les constituants du café, en partie via la réaction de Maillard et des réactions de pyrolyse. Ces composés, selon leur solubilité dans l'eau peuvent ensuite se retrouver partiellement dans le café boisson, sachant que les conditions de préparation du café boisson sont également déterminantes sur leur transfert dans la boisson. Certains d'entre eux ont une activité physiologique, ce qui conduit à des effets possibles du café boisson chez l'homme.

1.3 Les effets physiologiques du café boisson

De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence les effets possibles du café sur l'organisme. Ces effets sont nombreux, et parfois sujets à controverse comme indiqué ci-dessous, en particulier en ce qui concerne les effets pro- ou anti- cancérogène et mutagène [Higdon et Frei (2006); Tavani et La Vecchia (2000); Nehlig et Debry (1994)].

Si la caféine a souvent été incriminée comme la molécule responsable de ces effets, il est souvent difficile d'établir une corrélation entre l'effet observé et le ou les constituants du café qui en sont responsables, compte tenu de la composition très complexe du café comme nous l'avons déjà souligné. Par conséquent, certaines études se sont intéressées à l'étude des effets physiologiques de certains constituants particuliers du café, à l'aide de tests cellulaires ou sur animaux, mais elles présentent l'inconvénient de ne pas prendre en compte d'éventuels effets antagonistes ou synergiques de par la présence d'autres constituants dans le café. Enfin, il convient de souligner que le mode de préparation du café boisson a également son influence, puisqu'il impacte directement la composition de la boisson obtenue.

1.3.1 Les effets bénéfiques pour la santé

De très nombreuses études ont mis en évidence des effets bénéfiques de la consommation de café sur la santé, principalement une activité anti-oxydante, anti-cancérogène et anti-mutagène. Ces deux effets sont vraisemblablement corrélés, les anti-oxydants permettant de réduire l'occurrence de cancers en limitant la production d'entités oxygénées très réactives. D'autres effets physiologiques intéressants sont possibles, tels qu'une réduction du diabète de

type 2, ou un rôle protecteur contre l'apparition de la maladie de Parkinson ou de certaines maladies hépatiques.

1.3.1.1 L'activité anti-oxydante

Plusieurs constituants du café sont susceptibles de chélater certains ions métalliques, comme par exemple le fer ferreux, et donc d'avoir une activité anti-oxydante en limitant la dégradation de l'ADN. C'est le cas des polyphénols (principalement l'acide n-chlorogénique) et des mélanoidines (polymères bruns formés par la réaction de Maillard au cours de la torréfaction) [Morales (2005)]. En fait, bien que la teneur en acide chlorogénique diminue durant la torréfaction des grains comme nous l'avons déjà mentionné, l'activité anti-oxydante du café boisson obtenu à partir de café torréfié est plus élevée que celle du café vert grâce à la formation de produits de Maillard, en particulier les mélanoidines [Del Castillo et al. (2002)]. Le mode de préparation du café boisson (filtre, *napolitain* ou *expresso*) n'a pas fait ressortir de différence particulière en terme d'activité anti-oxydante [Parras et al. (2006)]. De même, il n'y a pas de corrélation simple entre l'activité anti-oxydante et le degré de torréfaction ; en effet, le café moyennement torréfié présente une activité anti-oxydante plus grande que le café légèrement torréfié, mais cette activité n'augmente pas pour un torréfaction forte. Ceci corrobore l'hypothèse selon laquelle la formation des mélanoidines se produit durant une phase particulière de la torréfaction [Manzocco et al. (1998)]. Les conditions de torréfaction doivent donc être parfaitement contrôlées, d'autant qu'il semble que dans certaines conditions des composés pro-oxydants soient formés, notamment dans les premières étapes de la réaction de Maillard (juste avant le réarrangement d'Amadori). Lorsque l'ajout de sucre est réalisé durant la torréfaction, l'activité anti-oxydante du café obtenu est plus élevée, le sucre étant un précurseur de la formation de mélanoidines [Lopez-Galilea et al. (2006)].

1.3.1.2 L'activité anticancérigène ou antimutagène

Plusieurs constituants du café semblent être à l'origine d'une activité protectrice du café contre certains types de cancer, en particulier celui du colon. Parmi ceux-ci, citons la caféine, des polyphénols (dont les acides chlorogéniques), ainsi qu'une fraction lipidique essentiellement constituée de cafestol et kahweol.

De nombreuses études ont été menées sur l'effet protecteur du café boisson envers le cancer colorectal. Si certains résultats ne montrent aucun effet particulier [Hartman et al. (1998)], d'autres font état d'une association entre consommation de café (au moins 3 ou 4 tasses par jour) et moindre occurrence du cancer du colon ou du rectum [Inoue et al. (1998); Tavani et al. (1997); Woolcott et al. (2002); Tavani et La Vecchia (2000)]. Parallèlement une plus faible

occurrence du cancer du colon a été observée chez des consommateurs de cafés contenant un taux élevé de cafestol et kahweol [Giovannucci (1998)]. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ce type de cancer est souvent lié à une exposition à certains agents cancérigènes présents dans certains aliments. En effet, des résultats récents montrent, grâce à des tests cellulaires et des tests chez des rongeurs (rat, souris, hamster), que le mélange (cafestol + kahweol) entraîne une réduction de l'activité génotoxique de plusieurs agents cancérigènes (dont le 7,12-diméthylbenz[*a*]anthracène, le benzo[*a*]pyrène, l'aflatoxine B1, la 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) et la *N*-nitrosodiméthylamine (NDMA)) [Cavin et al. (2001) ; Cavin et al. (2002); Majer et al. (2005)]. Ces effets biologiques ont souvent été observés pour des concentrations élevées en diterpènes, d'où un contexte différent des concentrations ingérées via le café boisson (même si cette boisson reste la principale voie d'exposition humaine au cafestol et au kahweol), et ce d'autant plus que le mode de préparation de la boisson est susceptible de modifier les concentrations en diterpènes obtenues comme nous l'avons souligné précédemment. En outre, ces essais sont menés sur des mélanges simples de cafestol et kahweol, et ne prennent donc pas en compte les autres composants du café qui, comme nous l'avons déjà mentionné, sont nombreux et diversifiés.

Les mécanismes d'action de ces diterpènes n'ont pas encore été complètement élucidés. Il apparaît que leur effet anticancérigène est dû en partie à une meilleure métabolisation des agents cancérigènes présents [Huber et al. (1997), Cavin et al. (2002)], apparemment par une induction de certaines enzymes détoxifiantes (comme la glutathione S-transférase ou l'UDP-glucuronyltransférase). D'autres mécanismes ont également été observés, tels qu'une inhibition des enzymes impliquées dans l'activation des molécules cancérigènes comme la sulfotransférase dans le cas de la *N*-nitrosodiméthylamine, ou la stimulation de certaines protéines participant à la réparation de l'ADN telle la O⁶-méthylguanine-DNA transférase [Huber et al. (2003) ; Majer et al. (2005)].

Une étude épidémiologique récente met en évidence le rôle protecteur du café boisson envers les cancers de la bouche, de la gorge et de l'œsophage, probablement grâce à la présence de molécules anti-oxydantes présentes dans la boisson [Tavani et al. (2003)]. Cependant des études complémentaires semblent nécessaires en raison de résultats contradictoires.

1.3.1.3 Autres effets bénéfiques possibles

La consommation de café semblerait limiter l'apparition de diabète de type 2 [Van Dam et Feskens (2002)]. En outre, au vu de certaines études épidémiologiques, la consommation de café jouerait un rôle protecteur contre l'apparition d'autres maladies, telle la maladie de

Parkinson ou des maladies hépatiques (cirrhose ou carcinome hépatique) [Higdon et Frei (2006)].

1.3.2 Les effets préjudiciables pour la santé

Plusieurs études menées sur le café boisson, ou plus récemment le café instantané, ont montré une corrélation vraisemblable entre l'ingestion de café et différents effets préjudiciables pour la santé de l'homme, même si ce ne sont que des suppositions puisque ces études sont menées via des essais *in vitro* (sur des cultures cellulaires) ou *in vivo* (le plus souvent chez des rongeurs), et que leur extrapolation à l'homme reste donc difficile en l'état actuel des connaissances. Quelques études ont porté plus particulièrement sur la mise en évidence d'effets toxiques de certaines molécules retrouvées dans le café ; nous reviendrons plus en détail sur la présence de certains contaminants chimiques (les hydrocarbures aromatiques polycycliques) dans le café dans le paragraphe 1.4.

1.3.2.1 L'activité hypercholestérolémiante

Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence une causalité entre la consommation de café bouilli (fréquemment consommé dans les pays Scandinaves) et l'augmentation de la teneur en cholestérol dans le plasma sanguin [Pietinen et al. (1990)]. Les études menées ont montré que cet effet est corrélé à la présence des deux diterpènes cafestol et kahweol dans la boisson [Urgert et Katan (1997) ; Weusten-Van der Wouw et al. (1993); Ratnayake et al. (1995)]. Cependant cet effet hypercholestérolémiant semble très spécifique du mode de préparation du café, notamment du café bouilli ou du café *turc* compte tenu de leurs concentrations élevées en diterpènes [Kark et al. (1985) ; Gross et al. (1997); Bak et Grobbee (1989)]. En effet, aucune activité hypercholestérolémiante n'a pu être observée pour le café filtre ou le café instantané, ce qui est en accord avec leurs faibles teneurs en cafestol et kahweol [Van Dusseldorp et al. (1991); Gross et al. (1997); Bak et Grobbee (1989)]. Sur la base d'une consommation de 5 tasses de café par jour, on peut estimer grossièrement l'augmentation du taux de cholestérol sanguin à moins de 0.05 mmol.L⁻¹ pour le café filtre et à environ 0.85 mmol.L⁻¹ pour le café bouilli [Gross et al. (1997)]. Par conséquent, l'effet majeur du cafestol et kahweol présents dans le café boisson semble plutôt être un effet anticancérigène ou antimutagène, puisque ces effets bénéfiques sont observés pour des taux d'exposition plus faibles que l'effet hypercholestérolémiant décrit [Majer et al. (2005)].

1.3.2.2 L'activité mutagène ou génotoxique

Il semble qu'il puisse y avoir une relation entre consommation de café et cancer de la vessie, sans que cela ait pu être clairement démontré car les études restent contradictoires ; par

conséquent si risque il y a, celui-ci reste modéré [Tavani et La Vecchia (2000); Woolcott et al. (2002); D'Avanzo et al. (1992)]. Pour cette raison, le café boisson a été classé 2B (cancérogène possible chez l'homme) pour ce type de cancer [IARC (1191)]. Des doutes subsistent également sur la corrélation entre consommation de café et cancer du pancréas, même si les études récentes ne font apparaître aucune association entre le café et ce type de cancer [Tavani et La Vecchia (2004); Michaud et al. (2001)].

Le café boisson ou instantané a également montré des effets mutagènes ou génotoxiques lors de différents tests biologiques sur bactéries ou de tests animaux. Une explication avancée est que ces effets sont associés à la présence d'espèces oxygénées très réactives, notamment le peroxyde d'hydrogène provenant de l'auto-oxydation des composés phénoliques (eux-mêmes issus de la décomposition de l'acide chlorogénique), qui survient préférentiellement à des pH basiques en raison de la dissociation du groupement phénol [Duarte et al. (1999)]. Ainsi, la teneur en peroxyde d'hydrogène du café boisson peut atteindre 2 mg.L^{-1} lorsque celui-ci vient d'être préparé, et elle peut fortement augmenter lorsque le café est laissé à l'air libre et température ambiante (jusqu'à environ 12 mg.L^{-1}) [Aoshima et Ayabe (2007)]. Parmi ces composés phénoliques, l'hydroxyhydroquinone a été identifiée comme génératrice d'espèces oxygénées réactives telles le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux hydroxyles [Hiramoto et al. (1998)]. Par conséquent, compte tenu du pH alcalin de l'intestin humain, il n'est pas exclu que ce type de mécanisme se produise chez l'homme.

D'autres produits toxiques peuvent également se former au cours de la torréfaction. Ainsi, l'étude du chauffage de mélanges simplifiés (trigonelline, acides aminés, glucose) a montré que la trigonelline génère des sous-produits ayant une activité mutagène lorsqu'elle est chauffée à 250°C [Wu et al. (1997)].

Certains tests sur animaux (hamster) laissent entendre que l'ingestion de café pourrait augmenter l'effet de certains agents cancérogènes, comme le 7,12-diméthylbenz[a]anthracène responsable de cancers de la bouche [Saroja et al. (2001)],

1.3.2.3 Autres effets préjudiciables possibles

La consommation de café entraîne une augmentation de la pression artérielle, liée à la caféine présente [Higdon et Frei (2006)]. Elle élève aussi la teneur en homocystéine dans le plasma sanguin d'environ $2 \text{ } \mu\text{mole.L}^{-1}$ [Grubben et al. (2000); Olthof et al. (2001)], l'acide n-chlorogénique semblant en partie responsable de cet effet qui pourrait constituer un facteur de risque de maladies cardiovasculaires. Toutefois des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ou non ce risque supplémentaire car la consommation de café n'a

pas montré de risque accru de mortalité chez des patients ayant fait un infarctus du myocarde [Mukamal et al. (2004)].

Enfin il est désormais bien établi que la consommation de caféine chez la femme enceinte peut induire un avortement spontané ou une fausse couche ; il est donc conseillé aux femmes enceintes de ne pas consommer plus de 3 tasses de café par jour, soit une consommation quotidienne d'environ 300 mg de caféine [Higdon et Frei (2006)].

1.4 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés hydrophobes et chimiquement inertes (cf structures en **annexe 2**). Toutefois ils sont métabolisés en diol-époxydes dans l'organisme, qui se lient de manière covalente à l'ADN, avec pour conséquence des erreurs dans la réplication de l'ADN et des mutations qui peuvent initier un processus de cancérogénèse [Philipps (1999)] (cf **annexe 3**).

Ces composés présentent la particularité de posséder à la fois des sources exogènes (contamination initiale des grains de café) et endogènes (formation lors de la torréfaction) comme nous allons le détailler.

1.4.1 Les teneurs en HAP de divers cafés

La majeure partie des études se sont consacrées à l'analyse des cafés verts et torréfiés pour des raisons de facilité d'analyse. En effet, en raison de leur caractère hydrophobe, les HAP sont très peu solubles dans l'eau ; par suite, les concentrations attendues dans le café boisson sont faibles, ce qui nécessite des méthodes analytiques sensibles. Cependant quelques études se sont intéressées au café boisson, directement ingéré par le consommateur, ainsi qu'à l'évaluation des coefficients de transfert des HAP du café torréfié moulu au café boisson.

1.4.1.1 Les teneurs en HAP des cafés verts, torréfiés et instantanés

Le benzo[*a*]pyrène a fait l'objet de la majeure partie des recherches concernant les HAP dans le café, ce qui se justifie par son caractère cancérigène et mutagène. Ainsi, les teneurs en benzo[*a*]pyrène de différents cafés sont données dans le **Tableau 1.14** suivant.

García-Falcón et al. (2005) ont également procédé à la recherche de plusieurs HAP (B[*a*]A, B[*b*]F, B[*k*]F, B[*a*]P, DB[*ah*]A, B[*ghi*]P et I[*1,2,3-cd*]P) dans divers échantillons de café instantané : 6 avec caféine, et 6 décaféinés. Pour chacun de ces deux lots, 3 échantillons sont torréfiés de manière classique (sans ajout de sucre), et 3 sont torréfiés après l'ajout de sucre au café. Seuls deux échantillons décaféinés (fortement torréfiés) contenaient du benzo[*b*]fluoranthène (0.03-0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), ainsi que du benzo[*k*]fluoranthène et du

benzo[a]pyrène (0.01-0.04 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Les concentrations estimées se trouvent à des niveaux compris entre la limite de détection et la limite de quantification de la procédure analytique mise en oeuvre.

Tableau 1.14 : Concentrations estimées en HAP de différents cafés verts, torréfiés et instantanés.

Types de cafés	Variétés étudiées	Provenance des cafés	Degré de torréfaction	HAP recherchés	HAP détectés	Teneurs en HAP ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Réf.
Vert	Mélanges, Arabica	Colombie, Mexique, Salvador, Brésil	---	B[a]P	B[a]P	< 0.01-0.95	Maier et al. (1991)
Verts et torréfiés	Arabica, Robusta	Brésil	Divers	B[a]P	B[a]P	0.47-12.52 (verts : non détecté)	Badolato et al. (2006)
Torréfié	Mélanges, Arabica, Robusta	Divers	Léger à fort	B[a]P	B[a]P	< 0.1-6.9	Maier et al. (1991)
Torréfié	Mélanges, Arabica, Robusta	Divers	Léger à fort	Anthr, B[a]A, F, Phen, Pyr, B[b]F, B[k]F, B[e]P, DB[ah]A, B[ghi]P, I[cd]P	Anthr, B[a]A, F, Phen, Pyr, B[b]F, B[k]F, B[e]P, DB[ah]A, B[ghi]P, I[cd]P	0.3-93	Maier et al. (1991)
Torréfié	---	Brésil	---	B[a]A, F, Pyr, Chrys, B[b]F, B[k]F, B[e]P, B[a]P, DB[ah]A, B[ghi]P	B[a]A, F, Pyr, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[ah]A	0.24-11.03	Camargo et Toledo (2002)
Torréfié	---	Europe	Moyen	B[a]P	B[a]P	< 0.2-1.2	Kruijff et al. (1987a)
Torréfié	---	Europe	Elevé (brûlé)	B[a]P	B[a]P	2.0	Kruijff et al. (1987a) et (1987b)
Torréfié	---	Pays-Bas	Moyen	B[a]P	B[a]P	< 0.1-0.5	Kruijff et al. (1987b)
Torréfié, espresso	Arabica, Robusta	Brésil, Nicaragua, Grèce, Italie	Modéré à fort	B[a]P	B[a]P	< 0.1-0.55	Ruschenburg et Jahr (1986)
Torréfié (avec ou sans caféine)	Mélanges, Arabica, Robusta	Divers	Faible à élevé	B[a]P	B[a]P	0.1-0.7	Hischenhuber et Stijve (1987)
Instantané (avec ou sans caféine)	----	---	Non précisé (mais avec ou sans ajout de sucre)	B[a]A, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[ah]A, B[ghi]P, I[cd]P	B[b]F, B[k]F, B[a]P,	0.01-0.1	García-Falcón et al. (2005)
Instantané	----	---	---	B[a]P	B[a]P	1.1	Lai et al. (2004)
Instantané	---	Europe	---	B[a]P	B[a]P	< 0.2	Kruijff et al. (1987a)

Dans la plupart des études, les concentrations estimées en benzo[a]pyrène dans le café moulu ne dépassent pas les 2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, sauf en cas de torréfaction élevée ou de surtorréfaction. Quant

aux autres HAP on observe des concentrations similaires, sauf pour le phénanthrène qui apparaît comme le composé majoritaire ($60-93 \mu\text{g.kg}^{-1}$), suivi du pyrène ($5.6-12 \mu\text{g.kg}^{-1}$) et du benzo[*a*]anthracène ($4-5 \mu\text{g.kg}^{-1}$) [Maier et al. (1991)].

1.4.1.2 Les teneurs en HAP du café boisson

Comme nous l'avons précédemment mentionné, très peu d'études ont été réalisées sur les teneurs en HAP du café boisson. Certains auteurs ont déterminé les concentrations dans l'infusion familiale et/ou le transfert dans celle-ci de benzo[*a*]pyrène [Maier (1991) ; De Kruijf et al. (1987a) et (1987b) ; Hischenhuber et Stijve (1987)]. Les concentrations retrouvées sont en général très faibles, souvent proches des limites de détection des procédures analytiques mises en œuvre.

Hischenhuber et Stijve (1987) ont déterminé la concentration de benzo[*a*]pyrène dans le café boisson obtenu avec un papier filtre, à partir de cafés torréfiés moulus dont les concentrations en benzo[*a*]pyrène sont estimées entre 0.19 et $0.74 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Les concentrations trouvées dans le café boisson sont entre 2 et 7 ng.L^{-1} , soit des coefficients de transfert variant entre 3.4 et 26.3% . Aucune corrélation avec la teneur en caféine des échantillons de café n'a pu être mise en évidence, alors que l'on aurait pu s'attendre à observer un coefficient de transfert croissant avec la teneur en caféine, celle-ci étant susceptible de complexer les HAP et donc de faciliter leur transfert dans la boisson. Au cours de cette étude, des ajouts connus en cet HAP ont été effectués sur du café moulu afin de voir la fraction qui passe ensuite dans le café boisson ; avec ces ajouts le coefficient de transfert du benzo[*a*]pyrène est abaissé ($0.5 - 2.5\%$), probablement car la solubilité du composé dans l'eau est limitante. Selon d'autres études menées la même année par De Kruijf et al. (1987a et 1987b), le coefficient de transfert du benzo[*a*]pyrène serait inférieur à 1% pour des échantillons de café non dopés. L'analyse du marc de café obtenu, soit avec une cafetière filtre, soit après filtration du café bouilli, a confirmé la faible solubilisation par l'eau chaude de cet HAP, la quasi-totalité ayant été retrouvée dans le marc.

Dans les études menées sur le café boisson, les modes de préparation varient comme indiqué dans le **Tableau 1.15**.

On observe généralement une baisse du coefficient de transfert lorsque la force de l'infusion (i.e. le rapport masse de café moulu / volume d'eau) augmente, probablement en raison d'une saturation de la boisson par les HAP qui sont peu solubles dans l'eau [Hischenhuber et Stijve (1987)].

Tableau 1.15 : Concentrations estimées en HAP de différents cafés boissons, et coefficients de transfert correspondants..

Types de cafés moulus	HAP analysés	Teneurs en HAP du café moulu ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Mode de préparation	Rapport café / eau chaude (g.L^{-1})	Teneurs en HAP du café boisson (ng.L^{-1})	Transfert des HAP (%)	Réf.
Vert	F, Pyr, B[a]A, Chrys, B[e]P, B[a]P, DB[ah]A, B[ghi]P	---	Filtre	167	Nd-7.4 (B[a]P : Nd)	---	Kayali-Sayadi et al. (1999)
Torréfié	B[a]P	0.76	Filtre	50-150	0.3 – 0.9	0.7-0.8	De Kruijf et al. (1987a)
Surtoirréfié	B[a]P	2.0	Filtre	50	0.8	0.8	De Kruijf et al. (1987a) et (1987b)
Surtoirréfié	B[a]P	2.0	Bouilli	50	1.0	1.0	De Kruijf et al. (1987b)
Torréfié	B[a]A, F, Pyr, Chrys, B[b]F, B[k]F, B[e]P, B[a]P, DB[ah]A, B[ghi]P	0.24-11.03	Filtre	100	Nd-2.8 (B[a]P : 0.26)	---	Camargo et Toledo (2002)
Torréfié (avec ou sans sucre), décaféiné	F, Pyr, B[a]A, Chrys, B[e]P, B[a]P, DB[ah]A, B[ghi]P	---	Filtre	167	Nd-10.9 (B[a]P : 1.6-3.4)	---	Kayali-Sayadi et al. (1999)
Torréfié	B[a]P	0.11-0.29	Bouilli	100	< 0.01	< 10	Ruschenburg et Jahr (1986)
Torréfié	B[a]P	0.19-0.74	Filtre	50-100	2-7	3.4-26.3	Hischenhuber et Stijve (1987)

Nd : non détecté

En considérant, au vu des études antérieures, une teneur moyenne en benzo[a]pyrène dans le café torréfié de $0.3 \mu\text{g.kg}^{-1}$, une consommation quotidienne de café boisson par personne équivalente à 20 g de café moulu, et un coefficient de transfert de 1%, De Kruijf et al. (1987a) ont évalué l'apport en benzo[a]pyrène par le café à environ 0.06 ng / jour / personne, ce qui représenterait seulement 0.03% de la quantité journalière ingérée. Seulement il faut aussi tenir compte d'éventuels autres HAP toxiques présents dans le café boisson, comme par exemple le dibenzo[a,h]anthracène qui a été reporté dans une autre étude avec des concentrations similaires à celles du benzo[a]pyrène [Kayali-Sayadi et al. (1999)]. Parmi les autres HAP présents, il semble que le pyrène soit le composé majoritaire, avec des concentrations entre 6.8 et 1.9ng.L^{-1} .

1.4.2 Les procédures analytiques mises en oeuvre

1.4.2.1 Analyse des HAP dans des cafés verts, torréfiés et instantanés

Plusieurs procédures analytiques ont été mises en oeuvre pour déterminer les HAP dans des échantillons de cafés verts, torréfiés ou instantanés, préalablement moulus, comme indiqué dans le **Tableau 1.16**.

Tableau 1.16 : Récapitulatif des procédures analytiques décrites pour la détermination des HAP dans le café moulu et instantané.

HAP	Extraction	Saponification	Purification	Analyse	Récupération (%)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Réf.
B[a]P	Aucune	KOH/MeOH	Lavage DMF/eau Gel de silice Elution éther de pétrole	GC-MS (SIM)	Non déterminé	0.1	Ruschenburg et Jahr (1986)
F, Pyr, B[a]A, Chrys, B[e]P, B[a]P, DB[ah]A, B[ghi]P	Aucune	KOH/EtOH (reflux, 40 min) Extraction cyclohexane	Lavage DMF/eau 9:1 Gel de silice (5 g) Elution cyclohexane Concentration	HPLC-FD	66.9 – 99.0	0.07 – 1.29	Kayali-Sayadi et al. (1999)
B[a]P	Aucune	KOH/EtOH (reflux, 40 min) Extraction cyclohexane	Lavage eau (4 fois) Séchage Na_2SO_4 Concentration Gel de silice (5 g) Elution cyclohexane Evaporation à sec Redissolution THF	HPLC-FD	87.2 – 115	Non déterminé	Hischenhuber et Stijve (1987)
B[a]P	Soxhlet (acétone, 6 h) Evaporation à sec	KOH/MeOH-eau 9:1 (reflux, 30 min) Extraction cyclohexane	Lavage eau Evaporation à sec Redissolution MeOH	HPLC-FD	78 - 97	0.1	De Kruijf et al. (1987a) et (1987b)
B[a]P	Soxhlet (acétone, 6 h) Evaporation à sec	KOH/MeOH-eau 9:1 (reflux, 30 min) Extraction cyclohexane	Lavage eau Concentration Gel de silice (5 g) Elution cyclohexane Evaporation à sec Redissolution ACN	HPLC-FD	85 - 99	0.03	Badolato et al. (2006)
B[a]P	Dissolution ACN/eau 50:50 SPE sur MIP	Aucune	Lavage eau Lavage ACN/eau 50:50 Elution CH_2Cl_2	HPLC-FD	72.5	Non déterminé	Lai et al. (2004)
B[b]F, B[k]F, B[a]P, B[ghi]P, I[cd]P, B[a]A, DB[ah]A	Extraction hexane (agitation, 10 min) Filtration	Aucune	Gel de silice (0.69 g) Elution hexane Evaporation à sec Redissolution ACN	HPLC-FD	87 - 103	0.01 – 0.05	Garcia-Falcon et al. (2005)

*LOD : limite de détection ; SPE : extraction en phase solide ; MIP : polymère à empreinte moléculaire
MeOH : méthanol ; EtOH : éthanol ; ACN : acétonitrile ; THF : tétrahydrofurane ; DMF : diméthylformamide*

Dans une étude récente menée sur le café instantané, plusieurs solvants ont été testés pour l'extraction par simple agitation des HAP [Garcia-Falcon et al (2005)]. L'hexane a donné de meilleurs taux de recouvrement que le dichlorométhane, et surtout que l'acétate d'éthyle. Afin de purifier cet extrait dans l'hexane, plusieurs supports solides ont été testés à l'aide de mini-colonnes : l'alumine, le florisil et la silice. Cette dernière s'est avérée la plus performante pour retenir les composés interférents lors de l'élution ensuite des HAP. Par conséquent, dans notre travail notre choix s'est porté sur la silice également pour la purification des extraits.

Dans leur étude sur le benzo[*a*]pyrène du café toréfié, De Kruijf et al. (1987b) n'ont pas mis en évidence la nécessité de réaliser une étape de saponification après une extraction Soxhlet à l'acétone.

1.4.2.2 Analyse des HAP dans le café boisson

Les procédures analytiques décrites pour la détermination des HAP dans le café boisson sont mentionnées dans le **Tableau 1.17**.

Dans une étude récente où le café boisson a été obtenu à partir de café soluble, l'extraction par *stir bar* a été testée, en raison de sa simplicité [Garcia-Falcon et al. (2005)]. Cependant les résultats n'ont pas été probants, d'une part en raison du manque de sensibilité du système, et d'autre part à cause de la saturation de l'absorbant par des composés majeurs du café.

1.4.3 Les sources de contamination du café par les HAP

1.4.3.1 Contamination lors du séchage ou du stockage

Au cours de l'étape de séchage à l'air, ou durant le stockage, une contamination des grains de café par dépôt atmosphérique est tout à fait envisageable. En effet, les HAP sont des polluants fréquemment retrouvés dans l'atmosphère car ils sont rejetés *via* les fumées d'usines, les systèmes de chauffage, ou les gaz d'échappement des véhicules. Il est désormais bien établi que nombre de végétaux exposés à une atmosphère contenant des HAP (notamment une atmosphère urbaine) sont contaminés principalement par dépôt atmosphérique. C'est donc une voie de contamination exogène possible.

Une autre voie potentielle réside en l'utilisation d'un système de séchage des grains basé sur la combustion. La présence des HAP dans les gaz de combustion peut ainsi entraîner un dépôt de ceux-ci sur les grains de café comme cela a déjà été observé pour d'autres denrées alimentaires tels que des céréales ou des graines oléagineuses [Maier (1991)].

Tableau 1.17 : Récapitulatif des procédures analytiques développées pour analyser les HAP dans le café boisson.

PAH	Extraction	Saponification	Purification	Analyse	Récupération (%)	LOD (ng.L ⁻¹)	Ref.
B[a]P	Aucune	Aucune	Lavage DMF/eau Gel de silice Elution éther de pétrole	GC-MS (SIM)	Non déterminé	10	Ruschenburg et Jahr (1986)
B[a]P	Extraction cyclohexane (3 fois) Séchage Na ₂ SO ₄ Concentration	Aucune	Gel de silice Evaporation à sec Redissolution MeOH	HPLC-FD	112 - 114	0.1	De Kruijf et al. (1987a) et (1987b)
B[a]P	Aucune	KOH (reflux, 30 min) KOH/EtOH/cyclohexane (reflux, 30 min) Filtration	Lavage eau (4 fois) Séchage Na ₂ SO ₄ Concentration Gel de silice (5 g) Elution cyclohexane Evaporation à sec Redissolution THF	HPLC-FD	Non déterminé	Near 10	Hischenhuber et Stijve (1987)
F, Pyr, B[a]A, Chrys, B[e]P, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[ah]A, B[ghi]P	Aucune	KOH (reflux, 30 min) KOH/EtOH/cyclohexane (reflux, 30 min) Filtration	Lavage DMF/eau 9:1 Gel de silice (5 g) Elution cyclohexane Concentration	HPLC-FD	Non déterminé	0.07 – 1.29	Camargo et Toledo (2002)
F, Pyr, B[a]A, Chrys, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[ah]A, B[ghi]P	Aucune	KOH/MeOH/eau (reflux, 90 min) Filtration laine de verre Dilution avec MeOH/eau Extraction isooctane	Lavage MeOH/eau 1:1 Extraction DMF/eau 9:1 Dilution avec eau Extraction isooctane Séchage Na ₂ SO ₄ Evaporation à sec Redissolution ACN/eau 60:40	HPLC-FD	Non déterminé		Lodovici et al (1995)
F, Pyr, B[a]A, Chrys, B[e]P, B[a]P, DB[ah]A, B[ghi]P	Silice C ₁₈ (0.5 g) Elution éther Evaporation à sec Redissolution MeOH Filtration PTFE	Aucune	Aucune	HPLC-FD	11 - 111	0.11-2.05	Kayali-Sayadi et al. (1999)

1.4.3.2 Contamination lors de la torréfaction des grains

Au cours de l'étape de torréfaction plusieurs processus peuvent se produire simultanément en théorie. Les plus vraisemblables sont une contamination des grains de café *via* une contamination exogène (principalement par les gaz de combustion) ou endogène (formation *in situ* des HAP par des réactions de pyrolyse par exemple). Cependant il n'est pas à exclure que

la torréfaction conduite à une élimination partielle des HAP présents dans les grains, soit en raison d'une dégradation de certains d'entre eux (mais se pose alors la question de savoir quels sont les sous-produits formés, notamment pour connaître leur toxicité), soit par une sublimation des HAP en raison de la température élevée de torréfaction.

Certaines études ont montré que les concentrations en HAP observées dans le café dépendent du degré ou de la température de torréfaction [Maier (1991) ; Badolato et al. (2006)]. Ainsi, le benzo[*a*]pyrène n'est détecté dans le café torréfié qu'à partir d'une température de torréfaction de 240°C (pendant 3 à 6 min). Des valeurs importantes sont observées dans des cafés fortement torréfiés (jusqu'à 6.9 µg.kg⁻¹) ou même partiellement brûlés (22.7 µg.kg⁻¹).

Les HAP peuvent être produits de façon endogène par des phénomènes de pyrolyse (i.e. absence d'oxygène) suivis de pyrosynthèse se produisant à haute température (i.e. réactions bimoléculaires entre les radicaux précédemment formés lors de la pyrolyse et des alcènes, alcynes ou aromatiques). A cet effet, certaines substances tels que les glucides ou polyphénols (ex : lignine, cellulose, acide chlorogénique), les acides aminés (ex : asparagine, proline, tryptophane, acide aspartique, acide glutamique, phenylalanine), les acides gras (ex : acides stéarique, oléique, linoléique, linoléique) et les stéroïdes (ex : stigmastérol, sitostérol), sont susceptibles de se dégrader selon le phénomène de pyrolyse dans des conditions bien définies, afin de conduire à la formation de certains HAP à 3, 4, voire 5 ou 6 cycles. Le **Tableau 1.18** synthétise les récentes études menées sur ce sujet. Le phénanthrène est très souvent reporté comme le composé majoritairement formé.

1.4.3.2.1 Formation des HAP à partir de lipides

Dans une étude récente, Chen et al. (2001) ont étudié la présence des HAP dans la fumée formée après chauffage d'huiles végétales à 200°C pendant 2 h. Plusieurs HAP ont été trouvés, dont le benzo[*a*]anthracène, le benzo[*b*]fluoranthène, le benzo[*k*]fluoranthène, le benzo[*a*]pyrène, le dibenzo[*a,h*]anthracène et l'indéno[*1,2,3-cd*]pyrène. Le degré d'insaturation des lipides semble influencer sur la nature et les concentrations des HAP formés. Ainsi, l'huile de soja conduit aux concentrations les plus élevées (662.4 µg.g⁻¹ pour la somme des HAP analysés), probablement en raison de son taux d'insaturation élevé. Ils ont également observé la formation des HAP lors du chauffage de certains lipides modèles (stéarate de méthyle, oléate de méthyle, linoléate de méthyle, linoléate de méthyle). Ils suggèrent que la formation des HAP à partir d'acide stéarique passe par une étape de dégradation des lipides suivie de réactions de Diels-Alder ; par contre, dans le cas des acides oléiques, linoléiques et linoléiques, une cyclisation intramoléculaire pourrait se produire. Ainsi

il apparaît que l'acide linoléique joue un rôle plus important que l'acide linoléique dans la formation des HAP.

Tableau 1.18 : La formation des HAP dans les aliments et leurs précurseurs possibles.

HAP formés	Précurseurs	Type de réaction	Température de chauffage	Durée de chauffage	Réf.
Acenaphtylène, Ace, Fluorene, Phen, Anthr, F, Pyr, Chrys, B[a]A, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[ah]A, I[cd]P	Acides gras	Formation de benzène	200°C	2 h	Chen et al. (2001)
N, Acenaphtylène, Fluorene, Phen, Anthr, F, Pyr, B[a]A, B[a]P	Cellulose, pectine, acide chlorogénique	Pyrolyse	300 - 850°C	87 – 1400 ms	Mc Grath et al. (2001)
Acenaphtylène, Fluorene, Phen, Anthr, F, Pyr, Chrys, B[a]A, B[a]P, DB[ah]A, B[ghi]P, I[cd]P	Cellulose, D-glucose, sucrose	Carbonisation (300°C) suivie d'une pyrolyse (400-650°C)	300-650°C	10 - 60 min	Mc Grath et al. (2003)
N, Acenaphtylène, Ace, Fluorène, Phen, Anthr, F, Pyr, Chrys, B[a]A, B[a]P	Stigmastérol, stigmastérol acétate, β -sitostérol, stigmasta-2,5-diene, cholestérol, cholesteryl acétate, dihydrocholestérol, ergostérol	Pyrolyse	550-800°C	0.1 - 2 s	Britt et al. (2001) ; Britt et al. (2003)
Acenaphtylène, Fluorène, Phen, Anthr, F, Pyr	Asparagine, proline	Carbonisation (300°C) suivie d'une pyrolyse (700-920°C)	300-920°C	0.1 – 3 s	Sharma et al. (2003)
Acenaphtylène, Fluorène, Phen, Anthr, F, Pyr	Acide aspartique, acide glutamique, glutamine	Carbonisation (300°C) suivie d'une pyrolyse (700-870°C)	300-870°C		Sharma et al. (2006)
N, Phen, Anthr	Stigmastérol	Pyrolyse	500-800°C	0.3 – 0.62 s	Shin et al. (2001)
N, Acenaphtylène, Fluorène, Phen, Anthr, F, Pyr B[a]A, Chrys, B[b]F, B[k]F	Acide chlorogénique, lignine	Carbonisation (250-400°C) suivie d'une pyrolyse (700-920°C)	250-920°C	0.14 s	Sharma et Hajaligol (2003)
N, Acenaphtylène, Ace, Fluorène, Phen, Anthr, F, Pyr, B[a]A, Chrys, B[b, j, k]F, B[a]P	Proline, glucose, composé d'Amadori de la proline	Carbonisation (460°C) suivie d'une pyrolyse (600-840°C)	460-840°C	1 – 10 s	Britt et al. (2004)
Fluorène, Phen, Anthr, F, Pyr B[a]A, Chrys, B[k]F, B[a]P, B[e]P	Phénylalanine	Pyrolyse	700-900°C	2 s	Wang et al. (2004)

1.4.3.2 Formation des HAP à partir de glucides ou polyphénols

McGrath et al. (2001) ont montré qu'à des températures élevées (300 et 600°C) la pyrolyse de la cellulose, lignine ou de l'acide chlorogénique donne lieu à divers HAP, possédant entre 2 et 5 cycles : naphthalène, acénaphtylène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène. L'augmentation de la durée de pyrolyse (87 à 1400 ms) conduit à une formation plus

importante des HAP, tout particulièrement de ceux à 3 et 4 cycles, de même que l'élévation de la température. Le benzo[*a*]anthracène et le benzo[*a*]pyrène n'ont été détectés que pour une pyrolyse à au moins 600°C pendant 350 ou 1400 ms. Ces résultats suggèrent une conversion à haute température des HAP à 2 ou 3 cycles, en des HAP à nombre de cycles plus important. Les rendements de formation des HAP sont plus élevés pour l'acide chlorogénique que pour la cellulose et la pectine, probablement en raison du caractère aromatique initial de ce précurseur. Dans le cas de la cellulose, le rendement de formation des HAP ayant entre 2 et 5 cycles est maximal pour des températures de pyrolyse entre 500 et 600°C [Mc Grath et al. (2003)]. Le D-glucose et le sucrose sont également des précurseurs des HAP lorsqu'ils sont soumis à une pyrolyse [Mc Grath et al. (2003)]. Les HAP semblent se former *via* un processus de carbonisation, où la matrice initiale subit une transformation chimique et un réarrangement pour donner une structure aromatique polycyclique plus condensée.

Les résultats de Sharma et Hajaligol (2003) suggèrent que la formation des HAP à partir de l'acide chlorogénique passe par la formation d'intermédiaires formés par pyrolyse, tels que le phénol et le catéchol. Un exemple de mécanisme de formation de structures à 2-4 cycles à partir du phénol a d'ailleurs été proposé comme présenté sur la **Figure 1.13**.

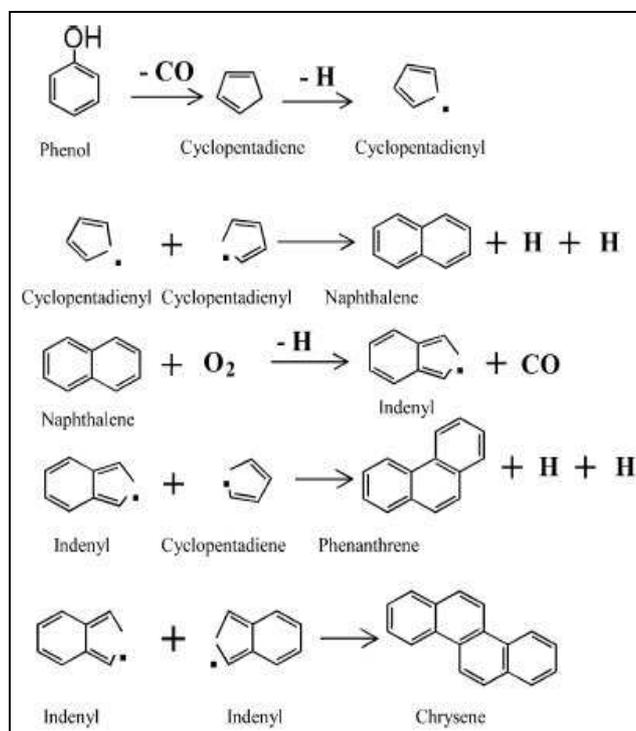


Figure 1.13 : Mécanisme proposé pour la formation du naphthalène, phénanthrène et chrysène à partir du phénol.

1.4.3.2.3 Formation des HAP à partir de stéroïdes

La pyrolyse du stigmasterol et de composés analogues donne également lieu à la formation de HAP à 2–4 cycles, ainsi qu'à leurs dérivés méthylés [Britt et al. (2001) ; Britt et al. (2003)]. Les rendements de formation dépendent de la nature du stéroïde initial ; en outre ils augmentent avec la durée et la température de pyrolyse, ainsi qu'avec la concentration du stéroïde. Sous certaines conditions (pyrolyse éclair sous vide) les HAP sont formés directement à partir de la structure du stéroïde, par des réactions unimoléculaires telles que des homolyses (i.e. rupture de certaines liaisons) et des réarrangements ultérieurs. En revanche, lorsque la pyrolyse est réalisée à pression atmosphérique, les réactions bimoléculaires avec des radicaux sont rendues possibles.

La cinétique de disparition du stigmasterol est d'ordre 1 entre 500 et 625°C [Shin et al. (2001)]. Un processus en deux étapes peut être supposé : (1) conversion du stigmasterol en composés aliphatiques très substitués, (2) conversion de ces intermédiaires en HAP. Dans ce cas on obtient des profils de concentration en fonction du temps comme illustré sur la **Figure 1.14**.

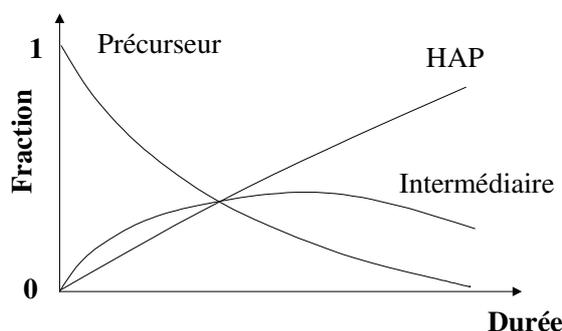


Figure 1.14 : Profils de concentration théoriques dans le cas d'une formation des HAP par un processus en 2 étapes.

1.4.3.2.4 Formation des HAP à partir d'acides aminés

La formation des HAP par pyrolyse d'acides aminés passe par un certain nombre d'intermédiaires. Ainsi, si le butadiène est un intermédiaire possible à partir de la proline, le succinimide et le maléimide ont été proposés à partir de l'asparagine et de l'acide aspartique [Sharma et al. (2003) ; Sharma et al. (2006)]. Quels que soient ces intermédiaires, la formation des HAP à partir d'acides aminés implique des réactions de déamination et de décarboxylation. Ainsi la décarboxylation de la proline conduirait à la pyrrolidine, qui après déshydrogénation donnerait la pyrroline et le pyrrole. Les HAP se forment à partir de 750°C et leur nature dépend de la structure de l'acide aminé. Il semble les HAP ne soient pas formés préférentiellement à partir de structures aromatiques puisque, dans les mêmes conditions, le

tryptophane (acide aminé comportant un noyau aromatique) ne donne pas lieu à leur formation contrairement à l'asparagine et la proline (2 acides aminés aliphatiques) [Sharma et al. (2003)].

Une étude souligne le rôle possible de la réaction de Maillard dans la formation des intermédiaires dans le cas de la proline [Britt et al. (2004)]. En effet, si les HAP sont observés lors de la pyrolyse de la proline à 840°C pendant 10 s, la présence de glucose permet d'augmenter les rendements de formation des HAP. Bien que ces rendements soient comparables à ceux constatés lors de la pyrolyse du produit d'Amadori de la proline, la nécessité de la formation de ce produit de Maillard n'a toutefois pas été confirmée.

1.4.3.2.5 Conclusion

De nombreux précurseurs possibles des HAP sont présents dans le café vert. Les études précédentes font apparaître la complexité des réactions de formation des HAP, avec la présence de composés intermédiaires et souvent la formation de radicaux. Cependant elles ont été menées sur des composés modèles, et dans des conditions de pyrolyse, donc sous atmosphère inerte et à haute température en phase gazeuse. Les conditions auxquelles sont soumis les grains de café au cours de la torréfaction sont donc très différentes, avec en particulier des températures moins élevées et des durées de chauffage plus importantes.

1.4.4 Conclusion sur les HAP dans le café

Il ressort de cette étude bibliographique que la détermination des HAP dans le café (que ce soit le café vert, torréfié, instantané ou boisson) nécessite des procédures analytiques sensibles et sélectives, en raison des très faibles teneurs attendues et des composés interférents du café susceptibles d'être co-extraits (et comme nous l'avons déjà précisé la composition du café est très complexe). Les analyses font donc souvent appel à des étapes longues, manuelles, et consommatrices de solvant. Malgré tout des divergences sont observées, certaines études soulignant l'importance d'une étape de saponification pour éliminer des lipides, alors que d'autres obtiennent des résultats satisfaisants sans mettre en œuvre cette saponification. Il nous a donc paru intéressant de nous attacher dans un premier temps à développer une procédure analytique pour le café boisson d'une part, et le café torréfié moulu d'autre part, en étudiant en particulier la nécessité ou non d'inclure une étape de saponification. Ceci a constitué la première partie de cette thèse et est présenté dans le chapitre 3, après le détail du matériel et des méthodes mis en œuvre dans ce travail.

Nous pouvons également constater que l'étude du devenir des HAP au cours de l'étape de torréfaction n'a pas été réalisée. Or ceci est pourtant nécessaire afin de comprendre l'origine

de la contamination par les HAP, et ensuite de la minimiser lorsque cela est possible. En effet, même si les quantités retrouvées dans le café boisson sont faibles, se pose la question de savoir quels sont les effets à long terme d'une ingestion chronique de faibles quantités de HAP. Aussi est-il vivement recommandé de limiter au maximum la présence des HAP dans les aliments d'une manière générale. Par conséquent la seconde partie de cette thèse a concerné l'étude des conditions de torréfaction sur la présence des HAP dans le café torréfié, et ensuite dans le café boisson ; ce travail est décrit dans le chapitre 4 de ce mémoire.

• **Chapitre 2:**
Matériels et méthodes

2 MATERIELS ET METHODES

Dans cette partie nous présenterons successivement les produits et réactifs utilisés au cours de notre étude, les méthodes de traitement des échantillons de café boisson et moulus, les conditions de torréfaction, et les méthodes analytiques mises en œuvre.

2.1 Produits et réactifs

2.1.1 Solvants

Les solvants utilisés pour mener à bien cette étude et faire la préparation des différentes solutions dans le cas de nos expériences sont donnés dans le **Tableau 2.1** suivant.

Tableau 2.1 : Les solvants utilisés et leur degré de pureté.

Solvants	Qualité	Pureté (%)	Fournisseurs
Acétone	pour HPLC	99.8	Prolabo
Méthanol (MeOH)	pour HPLC	99.9	Carlo Erba
Ethanol (EtOH)	pour HPLC	99.8	Carlo Erba
Acétonitrile (ACN)	pour HPLC	99.9	Carlo Erba
Cyclohexane	pour HPLC	99.8	Carlo Erba
n-Hexane	pour HPLC	97.0	Prolabo
n-Hexane	pour HPLC	98.0	Carlo Erba
Dichlorométhane	pour HPLC	99.5	Prolabo
Tétrahydrofurane (THF)	pour HPLC	99.8	Prolabo
Tétrahydrofurane	pour HPLC	99.8	Carlo Erba

A ces différents solvants s'ajoute l'eau déminéralisée produite par un système milli-Q de Millipore.

2.1.2 Standards et réactifs

Dans le cas des réactifs utilisés, nous disposons d'un mélange standard de 16 HAP à 10mg.L⁻¹ et de solutions standards individuelles (chacune à 10 mg.L⁻¹) de fluoranthène, benzo[b]fluoranthène et benzo[a]pyrène, tous dans l'acétonitrile. Nous avons également utilisé des produits comme de l'hydromatrix (terre de diatomées), de l'hydroxyde de potassium (KOH), de l'alumine (Al₂O₃), du sulfate de sodium (Na₂SO₄) anhydre, et de la pierre ponce. Les caractéristiques de ces produits et réactifs sont consignés dans le **Tableau 2.2**.

A partir des solutions standards à 10 mg.L⁻¹ en HAP, nous avons préparé des solutions mères à 1 mg.L⁻¹ avec un volume de 2 mL dans un solvant approprié (méthanol, acétonitrile, méthanol/THF (10/90, 20/80, 50/50 v/v), THF, ACN/eau (60/40 v/v)). A partir de ces solutions mères, des solutions étalons, d'une part des trois HAP et d'autre part des 16 HAP, ont été également préparées avec des concentrations variant de 0.4 à 100 µg.L⁻¹ et de 5 à 1000µg.L⁻¹.

Toutes ces solutions sont préparées et stockées dans des flacons ambrés afin de préserver les HAP de la lumière, et ensuite conservées à l'abri de la lumière à une température de 4°C (réfrigérateur) pendant six semaines environ.

Tableau 2.2 : Caractéristiques des produits et réactifs utilisés.

Produits et réactifs	Conditionnement	Concentration	Pureté (%)	Fournisseur
Mélange standard de 16 HAP	Acétonitrile	10 mg.L ⁻¹ / HAP		Supelco
Naphtalène			97.7	
Acénaphthylène			99.9	
Acénaphthène			99.9	
Fluorène			98.6	
Phénanthrène			99.9	
Anthracène			99.8	
Fluoranthène			98.2	
Pyrène			96.6	
Benzo[<i>a</i>]anthracène			97.9	
Chrysène			98.7	
Benzo[<i>b</i>]fluoranthène			99.9	
Benzo[<i>k</i>]fluoranthène			99.5	
Benzo[<i>a</i>]pyrène			99.9	
Dibenzo[<i>a,h</i>]anthracène			99.6	
Benzo[<i>g,h,i</i>]pérylène			99.1	
Indeno[<i>1,2,3-c,d</i>]pyrène			99.9	
Fluoranthène	Acétonitrile	10 mg.L ⁻¹	98.0	Cil Cluzeau
Benzo[<i>b</i>]fluoranthène	Acétonitrile	10 mg.L ⁻¹	99.5	Cil Cluzeau
Benzo[<i>a</i>]pyrène	Acétonitrile	10 mg.L ⁻¹	99.5	Cil Cluzeau
Hydromatrix	Solide	-	-	Varian S.A
Alumine (Al ₂ O ₃)	Solide	-	-	Merck
Sulfate de sodium anhydre	Solide	-	-	Merck
Pierre ponce	Solide	-	-	Merck
KOH	Solide	-	-	Prolabo

2.1.3 Matériel utilisé pour l'extraction en phase solide

Le système d'extraction en phase solide mis en œuvre est un système manuel VisiPrep (Supelco). Plusieurs types de cartouches ont été utilisés selon les expériences réalisées. Lorsque la technique de SPE a été mise en œuvre comme technique d'extraction, directement sur le café boisson (donc une phase aqueuse), des supports hydrophobes ont été choisis : soit de la silice greffée C₁₈ (ENVI-18, 0.5 g, 6 mL), soit du copolymère styrène-divinylbenzène (PS-DVB) (Bond Elut PPL, 0.2 g, 3 mL ou 0.5 g, 6 mL). Lorsque la technique de SPE a été utilisée comme technique de purification d'extraits, nous avons testé soit un support polaire (de la silice vierge, LC-Si, 1 g, 6 mL), soit un support apolaire (silice greffée C₁₈, ENVI-18, 0.5 g, 6 mL). Quelle que soit la nature de la cartouche, on la conditionne en faisant percoler un volume donné de solvant ou de plusieurs solvants afin d'activer le support. Toutefois, les solvants utilisés pour le conditionnement et l'élution des solutés dépendent de la nature de la

phase solide. On laisse la phase solide s'imprégner du ou des solvants pendant quelques minutes (5 min) avant la percolation. Ensuite à la fin de la percolation, on laisse un lit de 0.5 mm de solvant au-dessus de la phase afin d'éviter son séchage. Après le conditionnement, on fait passer l'échantillon dans la cartouche goutte à goutte (débit $\sim 1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) jusqu'à la dernière. Ensuite on introduit le solvant d'élution adéquat dans la cartouche pour permettre d'être en contact avec la phase solide pendant 5 min. On élue les solutés retenus sur la phase solide à un débit de $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à la dernière goutte. On reprend éventuellement cette étape d'élution plusieurs fois afin d'avoir un meilleur taux de recouvrement.

2.1.4 Cafés étudiés

Nous avons mené cette étude sur plusieurs échantillons de café 100% Arabica. Certains de ces cafés ont été achetés dans des supermarchés (parfois avec des lots différents du même café) ; ils sont déjà torréfiés, moulus, et issus de différentes origines [soit une origine bien spécifiée : Colombie (Grandes Origines du café – Leader Price), Guatemala (Grandes Origines du café – Leader Price), Brésil (Grandes Origines du café – Leader Price), Ehtiope-Inde (Grandes Origines du café – Leader Price), Kénya (Kitalé - Jacques Vabre), Chine (Yunnan - Jacques Vabre) ; soit un mélange de cafés (L'Or – Maison du Café)]. Nous avons aussi obtenu du café vert en grains (origine : Cuba), soit auprès de nos collègues de l'ENSIA (nous désignerons ce café « Café vert ENSIA »), soit auprès d'un détaillant du commerce (nous le nommerons « Café vert INA-PG »).

2.2 Méthodes de traitement des échantillons de café boisson

Les méthodes de traitement des échantillons de café boisson ont dans un premier temps été mises au point pour les trois HAP modèles, à savoir le fluoranthène, le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène. Ces trois composés diffèrent par leur solubilité dans l'eau et leur hydrophobicité ; ainsi le fluoranthène (solubilité aqueuse: $0.26 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) est plus soluble et moins hydrophobe que les deux autres (solubilités dans l'eau respectives du benzo[b]fluoranthène et du benzo[a]pyrène de 0.0015 et $0.0038 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Par la suite, nous avons étendu l'application de la méthode retenue aux 16 HAP considérés par l'US EPA comme polluants prioritaires.

2.2.1 Procédure de préparation du café boisson

Dans un bécher de 100 mL (en pyrex), on pose un filtre à café (filtre serti par pression sans colle ni produit liant) et on fait la pesée de 50 g de café moulu. On insère le filtre contenant le café moulu dans la cafetière, et on remplit celle-ci avec 300 mL d'eau milli-Q. Après mise en

marche de la cafetière, on recueille environ 200 mL de café boisson dans un bécher en pyrex (de 400 mL), un tiers environ du volume d'eau initial ayant été perdu car il a servi à mouiller le café moulu dans le filtre.

2.2.2 Extraction en phase solide directe du café boisson

On prélève 50 mL (ou 30 mL pour certaines expériences) de café boisson à l'aide d'une fiole jaugée, puis on les transvase dans un bécher de 100 mL. Pour les échantillons de café boisson dopés, on ajoute 100 μ L de la solution mère des 3 HAP (F, B[b]F, B[a]P), chacun à 1 mg.L⁻¹, préparée dans du méthanol. Les cafés boissons ainsi obtenus (dopés ou non dopés) subissent alors une extraction en phase solide sur des cartouches remplies de silice greffée (C₁₈, 0.5 g) ou de polystyrène/ divinylbenzène (PS-DVB, 0.2 ou 0.5 g).

2.2.2.1 SPE sur silice greffée C₁₈

Les cartouches ont été conditionnées avec successivement du méthanol (5 mL) et de l'eau (5 mL). Après passage des échantillons de café boisson dopés avec les trois HAP modèles, le fluoranthène, le benzo[b]fluoranthène, et le benzo[a]pyrène, les composés sont élués avec trois fractions de méthanol (4 mL chacune). Les différentes fractions sont récupérées dans des flacons de 7 mL.

Chaque bécher contenant initialement l'échantillon de café boisson, est ensuite rincé avec 8 mL de MeOH, et l'extrait recueilli évaporé sous azote jusqu'à environ 2 mL pour être directement analysé, afin de prendre en compte d'éventuelles pertes en HAP par adsorption sur les parois du récipient.

2.2.2.2 SPE sur copolymère styrène-divinylbenzène

Deux types de cartouches ont été utilisés : 0.2 g (3 mL) ou 0.5 g (6 mL) d'adsorbant. Pour chaque essai, elles ont été conditionnées avec successivement du méthanol (5 mL), un mélange MeOH/THF 50/50 (v/v) (5 mL) et de l'eau (5 mL). Nous avons en revanche testé différents mélanges MeOH/THF comme solvants d'éluion, ainsi que la réalisation d'une étape préalable de lavage afin d'éliminer certains composés co-élués. De plus dans certains cas deux SPE successives ont été réalisées.

Les différentes expériences menées sont récapitulées dans le **Tableau 2.3**. Comme précédemment, ces essais ont été réalisés en dopant les échantillons de café boisson avec les trois HAP modèles, le fluoranthène, le benzo[b]fluoranthène, et le benzo[a]pyrène. Lors de l'éluion, les différentes fractions sont récupérées dans des flacons de 7 mL.

Tableau 2.3 : Conditions de SPE testées sur copolymère PS-DVB.

Expérience n°	SPE	Masse d'adsorbant (g)	Lavage	Elution*
SPE-DVB 1	1 seule	0.2	Aucun	MeOH/THF 50/50 (4 x 2 mL)
SPE-DVB 1bis	2 en série	0.2	Aucun	MeOH/THF 50/50 (4 x 2 mL)
SPE-DVB 2	2 en série	0.2	Aucun	MeOH/THF 20/80 (3 x 2 mL ou 4 x 2 mL)
SPE-DVB 3	2 en série	0.2	Aucun	MeOH/THF 10/90 (3 x 2 mL ou 4 x 2 mL)
SPE-DVB 4	1 seule	0.5	Aucun	MeOH/THF 10/90 (3 x 2 mL)
SPE-DVB 5	1 seule	0.5	Essai 1 : MeOH/eau 50/50 (5 mL) Essai 2 : MeOH (5 mL) Essai 3 : Eau (5 mL)	MeOH/THF 10/90 (2 x 3 mL)
SPE-DVB 6	1 seule	0.5	Eau (5 mL)	MeOH/THF 10/90 (3 x 2 mL)
SPE-DVB 7	1 seule	0.5	MeOH (5 mL)	MeOH/THF 10/90 (3 x 2 mL)

* dans chaque cas, un temps de contact d'environ 5 min est laissé avant l'élution.

Les extraits obtenus ont été analysés sans concentration préalable. Toutefois, ceux-ci présentant un certain trouble, ils ont été filtrés avant leur analyse à l'aide d'un dispositif composé d'une seringue sans aiguille (2 mL) au bout de laquelle on fixe un filtre Nylon A Luer (13 mm, 0.45 µm).

Comme précédemment, chaque bécher contenant initialement l'échantillon de café boisson, est ensuite rincé avec 8 mL de MeOH, et l'extrait recueilli évaporé sous azote jusqu'à environ 2 mL pour être directement analysé, afin de prendre en compte d'éventuelles pertes en HAP par adsorption sur les parois du récipient.

2.2.3 Saponification préalable du café boisson

Il faut un volume suffisant de café boisson compte tenu de la procédure retenue pour la saponification comme détaillé ci-dessous. Par conséquent, nous avons préparé successivement 3 x 200 mL de café boisson avec la cafetière filtre comme mentionné précédemment, en conservant le même rapport masse de café moulu / volume d'eau percolé. Nous obtenons ainsi au total 600 mL de café boisson.

2.2.3.1 Saponification

Initialement nous avons appliqué les conditions décrites par Camargo et Toledo (2002), soit la saponification de 200 mL de café boisson ; ensuite nous avons adapté ces conditions à 50 mL de café boisson afin de rester dans la logique de nos manipulations.

On verse 200 mL de café boisson dans un ballon de 500 mL (ou 50 mL dans un ballon de 250 mL) ; pour les expériences menées sur du café dopé, on y ajoute 400 μL (ou 50 μL) de solution mère des 16 HAP à 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ préparée dans de l'acétone. Puis on ajoute 11.2 g (ou 2.8 g) de KOH. On chauffe le tout sous reflux pendant 30 min et on laisse refroidir. On ajoute ensuite 100 mL (ou 25 mL) d'une solution éthanolique de KOH à 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ et 200 mL (ou 100 mL) de cyclohexane. On réchauffe le tout à nouveau pendant 30 min avant de laisser refroidir totalement.

2.2.3.2 Extraction liquide-liquide

Les extraits obtenus après la saponification sont transvasés dans des ampoules à décanter de 1 L (ou 500 mL) et on ajoute 200 mL (ou 100 mL) d'eau milli-Q ; on agite vigoureusement le tout par un mouvement ascendant/descendant pendant 3 à 4 min et on laisse décanter, au besoin toute une nuit. On jette la phase aqueuse (phase inférieure) et on relave la phase organique (phase supérieure) avec 2 \times 200 mL (ou 2 \times 100 mL) d'eau milli-Q. On récupère la phase organique dans un ballon et on la sèche sur du sulfate de sodium anhydre. Après filtration sur du papier filtre sans cendres (qualité *Pour analyse*/Prolabo), l'extrait est recueilli dans des ballons de 250 mL.

On évapore ensuite les extraits à l'évaporateur rotatif jusqu'à environ 2 mL, puis on les concentre sous azote à environ 1 mL, avant de les purifier par extraction en phase solide au cours de laquelle on utilise des cartouches en silice.

2.2.3.3 Purification par SPE sur silice

Les cartouches de silice sont conditionnées avec 5 mL de cyclohexane. Après passage de l'extrait jusqu'à la dernière goutte, on élue les HAP avec 2 \times 5 mL de cyclohexane (fraction 1) suivis de 2 \times 5 mL du même solvant (fraction 2). On évapore les fractions recueillies sous azote jusqu'à environ 2 mL, puis on combine les deux fractions dans un même flacon et on évapore le tout à sec. On reprend le résidu avec 400 μL de THF en vue de son analyse.

2.3 Méthodes de traitement des échantillons de café moulu

Les HAP existant à l'état de trace dans les matrices étudiées, leur dosage nécessite des étapes d'extraction et de purification importantes. Ces HAP sont donc extraits par un solvant, soit par un solvant chaud sous pression (PSE), soit par la méthode du Soxhlet, soit directement au contact d'un solvant le tout chauffé.

2.3.1 Mise en œuvre de l'extraction accélérée par solvant

La technique d'extraction par un solvant sous pression à chaud (PSE) (ou extraction accélérée par solvant (ASE)) est une méthode appliquée aux matrices solides ou semi-solides. Ce système semi-automatisé d'extraction des composés organiques utilise des solvants à des températures très élevées maintenus à l'état liquide par une forte pression. Outre la nature du solvant d'extraction, le paramètre d'extraction le plus important est la température dont l'augmentation permet d'accroître la cinétique d'extraction, et donc de réduire la durée de l'extraction. En effet, une augmentation de 10°C conduit à une augmentation de la cinétique d'un facteur 2, avec simultanément une diminution de la viscosité du solvant permettant une meilleure pénétration de celui-ci dans la matrice et un accroissement de la solubilité des analytes.

Les principaux solvants utilisés dans le cas de l'extraction des HAP sont l'hexane, l'acétone, le mélange hexane/acétone 50/50, le méthanol, le dichlorométhane ou le toluène.

Le système mis en œuvre au cours de cette étude est un système ASE 100 (Dionex). Dans nos expériences, les conditions d'extraction ont été optimisées en faisant varier la température, le solvant, le nombre de cycles, le volume de rinçage (*flush volume*) et le temps de purge. En outre, différentes voies de purification des extraits obtenus ont été testées, notamment des purifications sur cartouche de SPE (silice greffée C₁₈ ou silice), des purifications *in situ* lors de l'extraction (avec de l'alumine), ou encore une saponification en milieu basique. Un récapitulatif des différentes procédures analytiques testées est présenté sur la **Figure 2.1**.

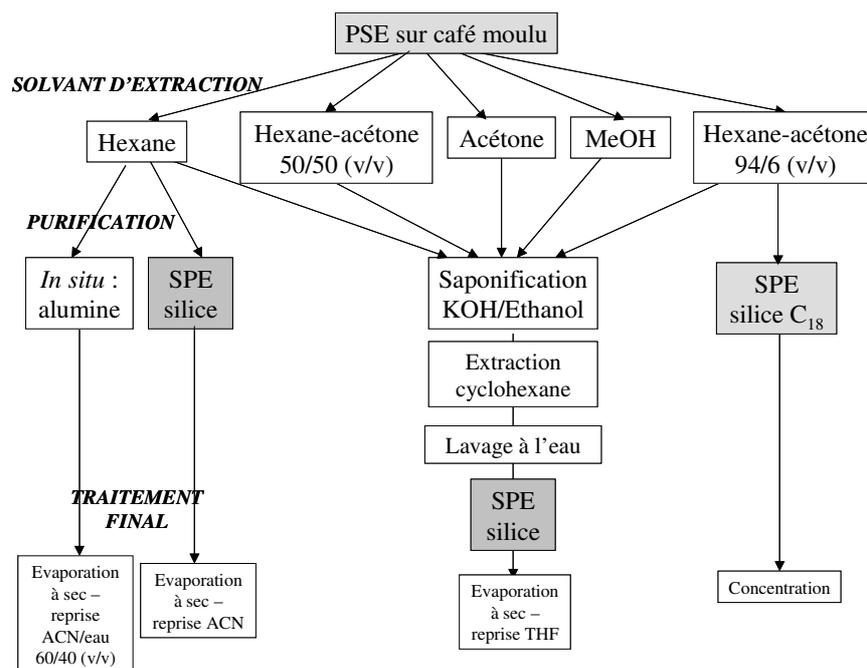


Figure 2.1 : Les différents essais menés à partir d'une extraction par un solvant chaud sous pression.

2.3.1.1 Purification *in situ* lors de l'extraction

Les essais menés au cours de cette étude ont porté sur les 3 HAP modèles (fluoranthène, benzo[*b*]fluoranthène et benzo[*a*]pyrène) dans un souci de simplification. Au cours de cette étude, nous avons procédé à différents essais, répertoriés dans le **Tableau 2.4**. L'alumine a été choisie car ce support polaire est fréquemment utilisé dans ce type de purification pour retenir des composés potentiellement co-extraits avec les HAP.

Tableau 2.4 : Description des différents expériences effectuées en PSE avec une purification *in situ* (IS) lors de l'extraction.

<i>N° expériences</i>	<i>Essais</i>	<i>Café moulu</i>	<i>Dopage en HAP</i>	<i>HAP étudiés</i>	<i>Solvant d'extraction</i>	<i>Conditions d'extraction</i>	<i>Traitement des extraits</i>
ASE-IS 1	n = 2	4 g Colombie lot-03-259	Non	---	n-Hexane	100°C, <i>flush</i> volume 60%, purge 100 sec, cycles 2 x 5 min	Evaporation à sec – reprise 0.5 mL ACN/ eau 60/40
ASE-IS 1bis	n = 2	4 g Colombie lot-03-259	50 ng / HAP	3 HAP	n-Hexane	Idem que ASE-IS 1	Evaporation à sec – reprise 0.5 mL ACN/ eau 60/40
ASE-IS 2	n = 2	4g Colombie lot-03-259	Non	---	n-Hexane	Idem que ASE-IS 1	Evaporation à sec – reprise 0.5 mL ACN
ASE-IS 2bis	n = 2	4g Colombie lot-03-259	50 ng / HAP	3 HAP	n-Hexane	Idem que ASE-IS 1	Evaporation à sec – reprise 0.5 mL ACN
ASE-IS 3	n = 1	4g Colombie lot-03-259 16/sep/05	Non	---	MeOH	120°C, <i>flush</i> volume 20%, purge 100 sec, cycles 2 x 5 min	Concentration à 0.5 mL - filtration
ASE-IS 4	n = 2	4g Colombie lot-03-259 16/sep/05	Non	---	MeOH	Idem que ASE-IS 1	Concentration à 0.5 mL - filtration

On mélange le café moulu (4 g) avec de l'hydromatrix (4 g) pour obtenir un mélange homogène. On place, au fond de la cellule (cellule de 34 mL), un filtre en fibre de verre pour empêcher les particules de boucher le système, suivi d'une couche d'alumine (4 g). On rajoute le mélange homogène (café / hydromatrix), soit en une seule fois (café non dopé), soit en deux fois afin de rajouter entre les deux remplissages la solution de dopage contenant les HAP (50 ng de chaque HAP). On finit de remplir la cellule avec des billes de verre.

Le temps de préchauffage est fixé à 5 min pour toutes les expériences, de même que le temps d'extraction statique. Le temps de purge à l'azote est de 100 sec. Deux cycles statiques sont

effectués successivement lors de chaque extraction. Les autres conditions sont détaillées dans le **Tableau 2.4**.

Les extraits obtenus sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à 2 mL environ, puis soit évaporés à sec sous azote lorsque le solvant d'extraction est l'hexane, avant d'être repris par un solvant identique à la phase mobile utilisée en HPLC-FD, soit concentrés sous azote jusqu'à 0.5 mL environ avant d'être filtrés et analysés par HPLC-FD. Lors des extractions à l'hexane, après évaporation à sec nous avons pu noter la présence d'une phase lipidique dans le résidu obtenu.

2.3.1.2 Purification par SPE après l'extraction

Les essais menés avec une purification *in situ* n'ayant pas été probants, nous avons testé la SPE comme technique de purification une fois l'extrait recueilli après la PSE, car c'est une technique relativement rapide, sélective et peu consommatrice de solvant. Ce faisant, nous avons également mis à profit ces expériences pour tester d'autres conditions d'extraction PSE comme cela est détaillé dans le **Tableau 2.5**.

Tableau 2.5 : Description des différents essais effectués en PSE et les types de cartouches utilisées pour la purification par SPE.

N° expériences	Essais	Café moulu	Dopage en HAP	HAP étudiés	Solvant d'extraction	Conditions d'extraction	Conditions SPE
ASE-SPE 1	n = 3	5 g Colombie lot-03-259	Non	---	n-Hexane	120°C, flush volume 100%, purge 90 sec, cycles 2 x 5 min	SPE 1 (Silice LC-Si, 1 g)
ASE-SPE 1bis	n = 3	5 g Colombie lot-03-259	50 ng / HAP avant l'ASE	3 HAP	n-Hexane	Idem que ASE-SPE 1	SPE 1 (Silice LC-Si, 1 g)
ASE-SPE 2	n = 3	5 g Colombie lot-03-259	50 ng / HAP avant l'ASE	3 HAP	n-Hexane	150°C, flush volume 100%, purge 90 sec, cycles 2 x 5 min	SPE 1 (Silice LC-Si, 1 g)
ASE-SPE 3	n = 3	5 g Colombie lot-03-259	50 ng / HAP après l'ASE	3 HAP	n-Hexane	Idem que ASE-SPE 1	SPE 1 (Silice LC-Si, 1 g)
ASE-SPE 4	n = 3	5 g Colombie lot-03-259 + 5 g Hydromatrix	50 ng / HAP avant l'ASE	3 HAP	Hexane/ acétone 94/6	100°C, flush volume 140%, purge 120 sec, cycles 3 x 5 min	SPE 2 (Silice greffée C ₁₈ , 0.5 g)
ASE-SPE 4bis	n = 3	5 g Colombie lot-03-259 + 5 g Hydromatrix	50 ng / HAP après l'ASE	3 HAP	Hexane/ acétone 94/6	Idem que ASE-SPE 4	SPE 2 (Silice greffée C ₁₈ , 0.5 g)
ASE-SPE 5	n = 3	5 g Colombie lot-03-334 + 5 g Hydromatrix	Non	---	Hexane/ acétone 94/6	Idem que ASE-SPE 4	SPE 3 (Silice greffée C ₁₈ , 0.5 g)
ASE-SPE 5bis	n = 3	5 g Colombie lot-03-334 + 5 g Hydromatrix	50 ng / HAP avant l'ASE	3 HAP	Hexane/ acétone 94/6	Idem que ASE-SPE 4	SPE 3 (Silice greffée C ₁₈ , 0.5 g)

A nouveau, ces essais ont porté uniquement sur les 3 HAP modèles pour la même raison que précédemment. On mélange le café moulu (5 g) avec de l'hydromatrix (5 g) pour obtenir un

mélange homogène. On place, au fond de la cellule (cellule de 34 mL), un filtre en fibre de verre pour empêcher les particules de boucher le système. On rajoute le mélange homogène (café / hydromatrix), soit en une seule fois (café non dopé), soit en deux fois afin de rajouter entre les deux remplissages la solution de dopage contenant les HAP (50 ng de chaque HAP). On finit de remplir la cellule avec des billes de verre.

Au cours de ces différentes expériences réalisées, nous avons procédé à différents types de dopage en HAP, à savoir avant ou après l'extraction PSE. Pour les dopages avant la PSE, la solution de dopage (contenant 50 ng de chaque HAP) a été incorporée dans l'échantillon contenu dans la cellule. Concernant les dopages réalisés après la PSE, différentes procédures ont été adoptées comme indiqué ci-dessous. Les extraits recueillis après la PSE ont également subi plusieurs types de traitement comme précisé :

- pour les expériences ASE-SPE 1, 1bis, 2 et 3, évaporation de l'extrait PSE jusqu'à environ 2 mL avant passage sur cartouche SPE.

- pour l'expérience ASE-SPE 3, l'extrait PSE a été concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à environ 5 mL ; ensuite nous avons ajouté à cet extrait concentré la solution de dopage (50 ng de chaque HAP), puis agité la solution pendant 1 à 2 min au vortex. L'extrait est ensuite évaporé jusqu'à environ 2 mL avant la SPE.

- pour l'expérience ASE-SPE 4, l'extrait PSE a été concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à environ 2 mL , puis évaporé à sec sous azote. Le résidu a été repris dans 3 mL d'ACN, agité au vortex, et le surnageant est récupéré ; ensuite on a rajouté 2 mL d'ACN au résidu lipidique et on a agité à nouveau avant de récupérer le surnageant après décantation. Les surnageants sont mélangés, et purifiés par SPE.

- pour l'expérience ASE-SPE 4bis, l'extrait PSE a été concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à environ 2 mL , puis évaporé à sec sous azote. Le résidu a été repris dans 3 mL d'ACN, agité au vortex, et le surnageant est récupéré ; ensuite on a rajouté 2 mL d'ACN au résidu lipidique et on a agité à nouveau avant de récupérer le surnageant après décantation. Les surnageants sont mélangés, et on leur ajoute la solution de dopage (50 ng de chaque HAP), avant d'agiter de nouveau pendant 1 à 2 min, et de faire ensuite la SPE.

- pour les expériences ASE-SPE 5 et 5bis, évaporation à sec de l'extrait PSE et reprise avec 5 mL ACN ; récupération du surnageant ; après agitation et décantation, évaporation à sec et reprise du résidu avec 2 mL ACN/eau 50/50 (v/v) avant passage sur cartouche SPE.

Pour la purification, le choix du support SPE a été fait d'après la nature du solvant résiduel de l'extrait concentré : un support polaire (silice) en présence d'hexane, un support apolaire (silice greffée C₁₈) en présence d'acétone. Dans le premier cas il s'agit d'un mode dit en phase

normale, pour lequel la rétention est basée sur un mécanisme d'adsorption ; dans le second cas on parle de mode à polarités de phases inversées, et la rétention est basée sur un mécanisme de partage.

L'extraction SPE se décompose en un certain nombre d'étapes en fonction de l'adsorbant utilisé et de la complexité de l'échantillon. Le principe fondamental est le fameux triangle d'équilibre entre le composé d'intérêt, la matrice et l'adsorbant. La procédure de mise en œuvre est la suivante :

(1) *Conditionnement* (ou solvatation) : il s'agit de conditionner la cartouche en mouillant la phase solide avec un solvant organique afin que les interactions puissent avoir lieu ; à partir de ce moment, la cartouche ne doit plus sécher.

(2) *Dépôt de l'échantillon* : on fait passer l'échantillon à travers le support.

(3) *Elution* : on récupère les composés d'intérêt avec un faible volume de solvant approprié.

Les conditions expérimentales que nous avons mises en œuvre dans nos expériences sont détaillées dans le **Tableau 2.6**. Tous les extraits ainsi obtenus ont ensuite été analysés par HPLC-FD.

Tableau 2.6 : Description des différents essais et des types de cartouches utilisées pour la purification par SPE après l'extraction PSE.

<i>N° expériences</i>	<i>Essais</i>	Solvant d'extraction PSE	Type de cartouche	Solvant de conditionnement	Solvant d'élution*	Traitement final
SPE 1	n = 3	n-Hexane	Silice LC-Si, 1 g	n-Hexane 5 mL	1: n-hexane 2x2.5 mL 2: n-hexane/CH ₂ Cl ₂ 50/50 2 x 2 mL	Evaporation à sec – reprise 1 mL ACN
SPE 2	n = 3	Hexane/ acétone 94/6	Silice greffée C ₁₈ , 0.5 g	MeOH 5 mL ACN 5 mL	1: ACN 2 x 2.5 mL 2: ACN 2 x 2.5 mL	Concentration à 0.5 mL
SPE 3	n = 3	Hexane/ acétone 94/6	Silice greffée C ₁₈ , 0.5 g	MeOH 5 mL MeOH/THF 50/50 5 mL ACN/eau 50/50 5 mL	1: MeOH/THF 10/90 2 x 2.5 mL 2: MeOH/THF 10/90 2 x 2.5 mL	Concentration à 0.5 mL

*1/ indique la première fraction d'élution, et 2/ la deuxième fraction d'élution du même échantillon.

2.3.1.3 Purification par saponification après l'extraction

Cette partie de l'étude a été réalisée en focalisant nos recherches sur les 16 HAP de l'US EPA. Tous les dopages d'échantillons ont été réalisés à partir d'une solution mère des 16 HAP (chacun à 1 mg.L⁻¹) dans l'acétone.

2.3.1.3.1 Conditions d'extraction PSE

Nous avons mis à profit ces essais pour tester différents solvants et températures d'extraction comme détaillé dans le **Tableau 2.7**. La durée de préchauffage a toujours été maintenue à 5 min comme précédemment, ainsi que le temps d'extraction statique. Les autres conditions sont mentionnées dans le tableau. Les extraits PSE ainsi obtenus sont transvasés dans des ballons de 250 mL et évaporés à sec à l'évaporateur rotatif en vue d'une saponification.

Tableau 2.7 : Description des différentes expériences effectuées en PSE avec une saponification (SAP) réalisée après l'extraction.

<i>N° expériences</i>	<i>Essais</i>	Café moulu	Dopage en HAP	HAP étudiés	Solvant d'extraction	Conditions d'extraction	Traitement des extraits
SAP 1	n = 1	5g Colombie lot-04-036 + 5 g hydromatrix	50 ng / HAP	16 HAP	Hexane/ acétone 94/6 (v/v)	100°C, <i>flush volume</i> 140%, purge 120 sec, cycles 3 x 5 min	Evaporation à sec
SAP 2	n = 2	5g Colombie lot-04-265 + 5 g hydromatrix	50 ng / HAP	16 HAP	n-Hexane	Idem que SAP 1	Evaporation à sec
SAP 3	n = 2	5g Colombie lot-04-265 + 5 g hydromatrix	50 ng / HAP	16 HAP	Hexane/ acétone 50/50 (v/v)	Idem que SAP 1	Evaporation à sec
SAP 4	n = 2	5g Colombie lot-04-265 + 5 g hydromatrix	50 ng / HAP	16 HAP	MeOH	Idem que SAP 1	Evaporation à sec
SAP 5	n = 2	5g Colombie lot-04-265 + 5 g hydromatrix	50 ng / HAP	16 HAP	Acétone	Idem que SAP 1	Evaporation à sec
SAP 6	n = 2	5g Colombie lot-04-265 + 5 g hydromatrix	50 ng / HAP	16 HAP	Hexane/ acétone 50/50 (v/v)	120°C, <i>flush volume</i> 140%, purge 120 sec, cycles 3 x 5 min	Evaporation à sec
SAP 7	n = 2	5g Colombie lot-04-265 + 5 g hydromatrix	50 ng / HAP	16 HAP	Hexane/ acétone 50/50 (v/v)	150°C, <i>flush volume</i> 140%, purge 120 sec, cycles 3 x 5 min	Evaporation à sec

Dans ces mêmes conditions, des cafés moulus non dopés ont également été extraits et traités de la même manière, afin de prendre en compte la présence d'HAP natifs dans les échantillons de café considérés.

2.3.1.3.2 Saponification

Aux différents résidus contenus dans les ballons de 250 mL obtenus après l'évaporation, on ajoute 1.5 g de KOH, 25 mL d'éthanol et quelques pierres ponce. On chauffe le tout sous reflux pendant 30 min. On laisse refroidir et on rajoute 100 mL de cyclohexane ; ensuite on

chauffe à nouveau sous reflux pendant 5 min, avant de laisser le mélange refroidir. Celui-ci est ensuite transvasé dans des ampoules à décanter de capacité 500 mL.

2.3.1.3.3 Extraction liquide-liquide

Dans chaque ampoule à décanter, on introduit 100 mL d'eau milli-Q et on agite vigoureusement pendant 3 à 4 min, puis on laisse décanter (au besoin toute une nuit). On jette la phase aqueuse (celle du bas) et on relave la phase organique avec 2 x 100 mL d'eau milli-Q. A la fin du lavage et après décantation, on récupère la phase organique dans des ballons de 500 mL et on la sèche avec du sulfate de sodium anhydre (5-10 g). On récupère l'extrait liquide après filtration sur du papier filtre sans cendres (pour analyse/Prolabo) dans des ballons de 250 mL. On évapore les extraits ainsi obtenus à l'évaporateur rotatif jusqu'à environ 2 mL, puis sous azote jusqu'à environ 1 mL. L'extrait ainsi concentré est ensuite soumis à une purification sur des cartouches SPE en silice LC-Si (1 g) comme détaillé ultérieurement.

2.3.1.3.4 Purification par SPE

Quel que soit le solvant d'extraction PSE testé dans ces expériences, les conditions de mise en œuvre de la purification SPE sont restées les mêmes, à savoir : conditionnement – cyclohexane (5 mL) ; 1^{ère} fraction d'élution - cyclohexane (2 x 5 mL) ; 2^{ème} fraction d'élution - cyclohexane (2 x 5 mL). Les extraits ainsi obtenus sont évaporés jusqu'à environ 1 mL, puis combinés dans un même flacon avant d'être évaporés à sec, repris par 400 µL de THF et analysés par HPLC-FD.

2.3.1.3.5 Différents modes de dopage

Dans le souci de lever certaines équivoques en ce qui concerne les résultats obtenus lors des expériences précédentes, nous avons effectué des essais complémentaires en réalisant le dopage en HAP à différentes étapes de la procédure analytique, ceci afin de mettre en évidence les étapes responsables des pertes en HAP observées. Lors de ces essais les conditions d'extraction PSE sont restées inchangées (c'est-à-dire 5 min de préchauffage, température 100°C, *flush volume* 140%, purge 120 sec, temps d'extraction statique de 5 min et 3 cycles). On a utilisé comme solvant d'extraction le mélange hexane/acétone 50/50 (v/v) pour tous ces essais. Le **Tableau 2.8** précise les modalités de ces différents essais de dopage.

Tableau 2.8 : Description des expériences menées en effectuant de dopage (DOP) à différentes étapes de la procédure analytique mettant en œuvre la PSE et une saponification.

<i>N° expériences</i>	<i>Essais</i>	<i>Café moulu</i>	<i>Dopage en HAP</i>	<i>HAP étudiés</i>	<i>Etape testée</i>	<i>Commentaires sur le dopage</i>
DOP 1	n = 2	5g Colombie lot-04-265 + 5 g hydromatrix	50 ng / HAP après l'ASE	16 HAP	Saponification	Dopage des extraits PSE, avant leur évaporation
DOP 2	n = 2	5g Colombie lot-04-265 + 5 g hydromatrix	50 ng / HAP avant la SPE	16 HAP	SPE	Extraits PSE évaporés à sec, saponifiés, concentré à 1 mL puis dopage avant la SPE
DOP 3	n = 2	5g Colombie lot-04-265 + 5 g hydromatrix	50 ng / HAP après la SPE	16 HAP	Evaporation à sec	Extraits PSE évaporés à sec, saponifiés, concentrés à 1 mL, purifiés par SPE. Dopage des 1 ^{ères} fractions d'éluion, avant évaporation à sec et reprise du résidu avec 400 µL de THF

2.3.2 Mise en oeuvre de l'extraction par Soxhlet

Cette méthode a été utilisée par De Kruijf et al. (1987b) pour extraire du benzo[a]pyrène de 15-20 g de café moulu en utilisant comme solvant d'extraction l'acétone. Dans nos expériences, nous avons placé 15 g de café moulu dans une cartouche en cellulose. Lorsque le café a été dopé, nous avons ensuite déposé sur le café la solution de dopage contenant 150 ng de chaque HAP (16 HAP). L'extraction a ensuite été réalisée avec 200 mL d'acétone, répartis de la manière suivante : 100 mL d'acétone sont versés initialement dans la cellule d'extraction, et 100 mL d'acétone dans le ballon de 250 mL. Le solvant placé dans le ballon est ensuite chauffé à l'aide d'un chauffe-ballon afin de l'évaporer. L'extraction dure 6 h, avec en moyenne 2 à 3 cycles par heure. Les extraits recueillis sont ensuite directement évaporés à sec avec un évaporateur rotatif. On procède ensuite comme pour l'extraction PSE précédemment, à savoir une saponification, une extraction liquide-liquide avec du cyclohexane, une concentration des extraits à environ 1 mL, puis une purification SPE sur cartouches de silice LC-Si (1 g). L'ensemble de la procédure analytique est présenté sur la **Figure 2.2**.

Pour la purification par SPE, nous avons utilisé 5 mL de cyclohexane pour le conditionnement de la cartouche, et élué les solutés avec deux fractions de 2 x 5 mL de cyclohexane chacune. On évapore les deux fractions à environ 1 mL puis on les transvase dans un même flacon, et on évapore à sec. Le résidu est repris avec 400 µL de THF.

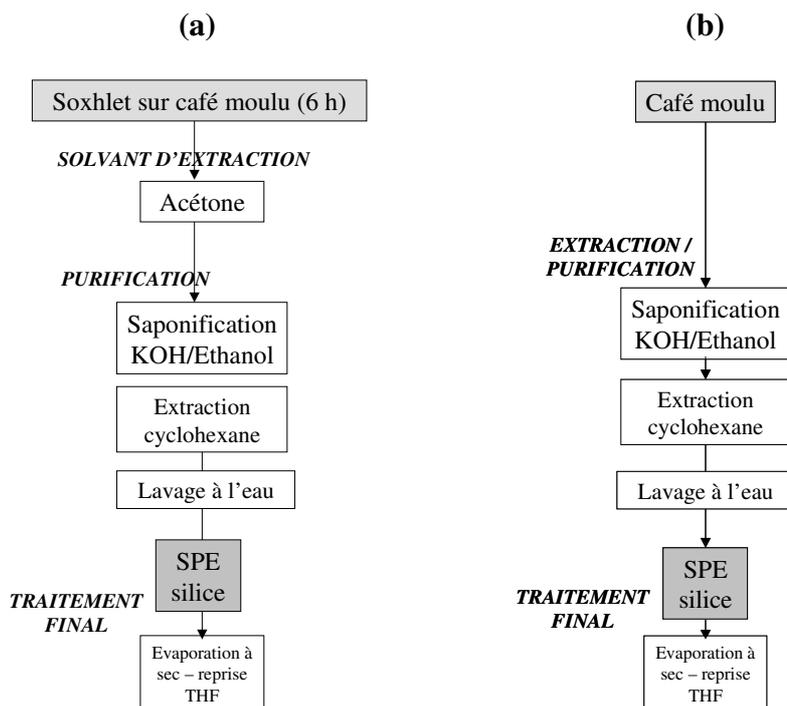


Figure 2.2 : Les procédures analytiques mettant en œuvre (a) une extraction par Soxhlet, (b) une saponification directe.

2.3.3 Mise en œuvre d'une saponification alcaline directe

Cette méthode a été décrite notamment par Hischenhuber et Stijve en 1987. Dans un ballon de 500 mL, on place 15 g de café moulu et 200 mL de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 1 mol.L^{-1} , ainsi que quelques pierres ponce. Dans le cas de café dopé, la solution de dopage est ensuite rajoutée (150 μL de la solution mère de 16 HAP à 1 mg.L^{-1} , afin de doper avec 150 ng de chaque HAP). On chauffe sous reflux le mélange pendant 40 min. On laisse refroidir, puis on rajoute 200 mL de cyclohexane et on réchauffe le tout pendant 5 min. On laisse refroidir à nouveau, avant de filtrer le tout sur du papier filtre sans cendres préalablement imbibé avec quelques mL du même solvant (cyclohexane). Le filtrat est récupéré dans une ampoule à décanter de 1 L. On procède ensuite à une extraction liquide-liquide en utilisant 3 x 200 mL d'eau milli-Q, en récupérant la phase organique que l'on sèche avec du sulfate de sodium anhydre (voir **Figure 2.2**). Après filtration sur du papier filtre sans cendres, l'extrait obtenu est concentré jusqu'à environ 1 mL comme détaillé précédemment, puis purifié par SPE sur cartouches de silice LC-Si (1 g). Le support est conditionné avec 5 mL de cyclohexane, l'élution des solutés se fait avec 2 x 5 mL de cyclohexane suivi de 2 x 5 mL de cyclohexane pour le même échantillon ; ensuite on concentre les deux fractions à

environ 1 mL et on les transvase dans un même flacon, avant d'évaporer le tout à sec, puis de reprendre le résidu avec 400 μ L de THF.

2.4 Torréfaction des échantillons de café vert

Tous les échantillons de café vert ont été torréfiés à l'ENSIA dans un torréfacteur à lit fluidisé représenté sur la **Figure 2.3**. Ce torréfacteur pilote a déjà fait l'objet d'études concernant la torréfaction du café, afin de mesurer et d'évaluer en ligne certains paramètres importants relatifs à la qualité du café, tels que couleur, température du grain, émission de CO et CO₂, perte en masse et teneur en eau [Hernandez Perez (2002) ; Valdovinos Tijerino (2005)].

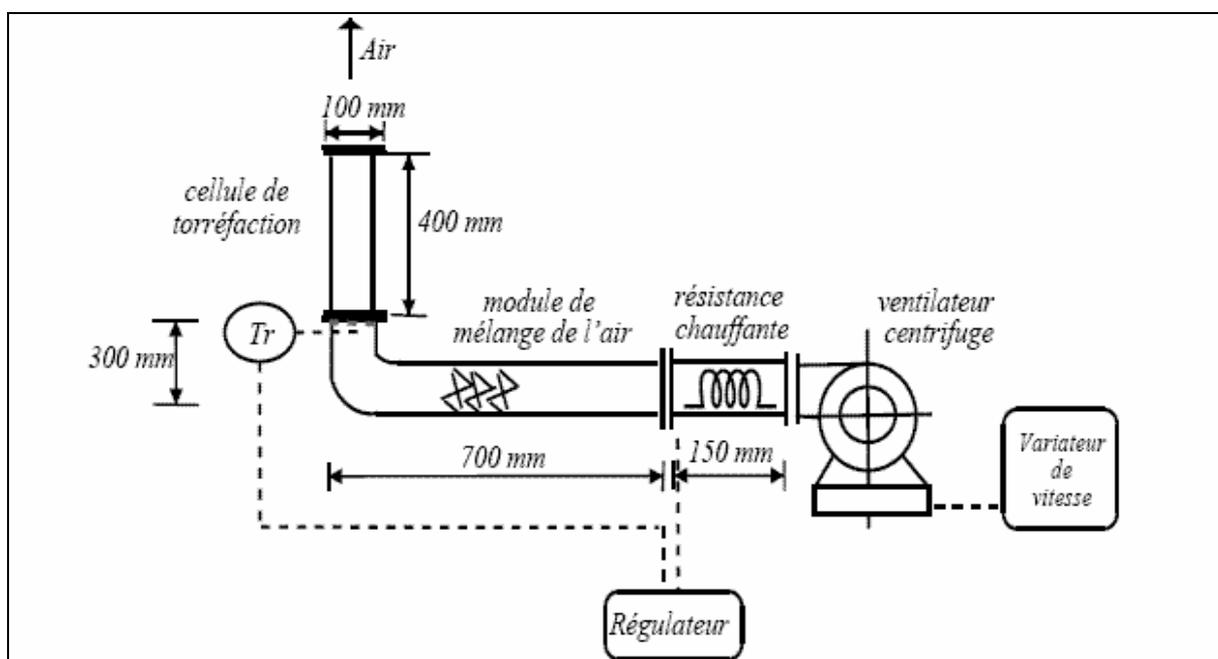


Figure 2.3 : Schéma de principe du torréfacteur à lit fluidisé mis en œuvre dans ce travail [Valdovinos Tijerino (2005)].

On introduit 100 g de café vert dans la cellule de torréfaction, celle-ci étant en pyrex et équipée d'une grille métallique dans sa partie inférieure permettant de retenir les grains de café. On fait venir l'air chaud dans la cellule avec une vitesse de 4 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. La température de l'air d'entrée est mesurée grâce à un thermocouple de type K (1 mm de diamètre) placé à l'entrée de la cellule ; sa régulation est assurée par un régulateur de marque CDRDOM (modèle CKRD2430).

Nous avons torréfié nos grains de café vert à différentes températures de l'air d'entrée, à savoir 180, 200, 220, 240, 250 et 260°C, et ce pendant des durées variables : 5, 8, 10, 13, 15 et 20 min (voir **Tableau 2.9**). Quelques expériences complémentaires à certaines durées ou

températures de torréfaction ont également été réalisées ponctuellement lors des essais de modélisation de la cinétique de formation des HAP.

Tableau 2.9 : Description des expériences menées lors de l'étude des conditions de torréfaction.

<i>N° expériences</i>	<i>Essais</i>	Café vert (Cuba)	Température de l'air entrant (°C)	Température de l'air sortant (°C)	Température moyenne dans la cellule de torréfaction (°C)	Durée de torréfaction (min)
TORR 1	n = 3	ENSIA	180	170.4	175.2	5
TORR 2	n = 3	ENSIA	180	170.4	175.2	20
TORR 3	n = 3	ENSIA	200	188.8	194.4	5
TORR 4	n = 3	ENSIA	200	188.8	194.4	20
TORR 5	n = 3	ENSIA	220	207.1	213.5	5
TORR 6	n = 3	ENSIA	220	207.1	213.5	20
TORR 7	n = 3	INA P-G	240	225.3	232.6	5
TORR 7bis	n = 1	ENSIA	240	225.3	232.6	5
TORR 8	n = 3	INA P-G	240	225.3	232.6	20
TORR 9	n = 3	INA P-G	250	234.4	242.1	5
TORR 10	n = 3	INA P-G	250	234.4	242.1	20
TORR 10bis	n = 1	ENSIA	250	234.4	242.1	20
TORR 11	n = 3	ENSIA	260	243.5	251.6	5
TORR 12	n = 3	ENSIA	260	243.5	251.6	8
TORR 13	n = 3	ENSIA	260	243.5	251.6	10
TORR 14	n = 3	ENSIA	260	243.5	251.6	13
TORR 15	n = 3	ENSIA	260	243.5	251.6	15
TORR 16	n = 3	ENSIA	260	243.5	251.6	20

Les cafés torréfiés ainsi obtenus ont été conservés dans des récipients fermés en polypropylène. Avant analyse, une prise d'essai conséquente a été moulue à l'aide d'un moulin à café électrique (SEB) et homogénéisée.

2.5 Méthodes analytiques

Après l'obtention des divers extraits issus des différentes méthodes d'extraction appliquées, on peut se consacrer plus aisément à l'analyse proprement dite des HAP contenus dans ceux-ci. Dans cette étude, on se limitera à l'identification et la quantification des 16 HAP référencés par l'US EPA comme étant les 16 HAP prioritaires les plus présents lors de la combustion incomplète ou la pyrolyse de matières organiques à haute température.

Selon les appareils disponibles, les 16 HAP peuvent être dosés par chromatographie liquide haute-performance (HPLC) avec détection par fluorescence (FD) ou ultraviolet (HPLC-UV), ou par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS). Les limites de détection sont similaires dans le cas des couplages HPLC-FD et GC-MS, mais légèrement supérieures avec le système HPLC-UV du fait de la non-sélectivité de ce détecteur. Le laboratoire disposant de ces trois appareils, les 16 HAP seront identifiés en tenant compte du

temps de rétention et quantifiés à l'aide de l'HPLC-FD, et cette identification sera ensuite confirmée en GC-MS/MS et/ou en HPLC-UV.

2.5.1 Analyse quantitative des HAP par HPLC-FD

Une chromatographie HPLC à polarité de phases inversée a été utilisée pour la séparation des composés d'intérêt. Une colonne analytique de silice greffée C₁₈ a été choisie, et un gradient de phase mobile a été mis en œuvre (la phase mobile doit en effet posséder une force éluante suffisante pour permettre l'élution des HAP les plus hydrophobes). La détection par fluorescence a été utilisée, d'une part pour quantifier les HAP du fait de sa très forte sensibilité, et d'autre part pour identifier ces HAP en se basant sur leur temps de rétention préalablement défini à l'aide de solutions standards. L'analyse HPLC-FD est souvent recommandée pour l'analyse des HAP en raison de sa grande sélectivité (par le choix des longueurs d'onde d'excitation et d'émission adaptées) et de sa sensibilité importante.

Les caractéristiques de l'appareillage, les différents programmes d'analyse et les méthodes de quantification sont répertoriés en **annexe 4**, y compris le temps de rétention de chaque HAP. La quantification des HAP a été faite grâce à l'utilisation d'un étalonnage externe. Des droites d'étalonnage ont été réalisées pour chaque HAP, grâce à l'analyse de solutions étalons de différentes concentrations. Les coefficients des droites de régression sont nettement supérieurs à 0.95 pour chaque HAP (voir **annexe 4**). Les équations de droite [Aire = f(concentration) + b] permettent d'obtenir les concentrations inconnues des échantillons. Les limites de détection déterminées pour cette étude varient de 0.11 µg.kg⁻¹ (chrysène) à 0.33 µg.kg⁻¹ (fluorène).

2.5.2 Analyse qualitative des HAP par HPLC-UV-DAD

Cette technique d'analyse étant moins sensible que l'analyse par HPLC-FD, elle n'a été utilisée que d'un point de vue qualitatif du fait des faibles concentrations en composés analysés. En effet le détecteur UV à barrette de diodes (DAD *diode-array detector*) permet de mesurer les absorbances moléculaires en fonction des longueurs d'onde. Les plus fortes intensités correspondent aux longueurs d'ondes entre 190 et 380 nm, ce qui correspond au domaine de l'ultraviolet. Cette technique permet donc d'obtenir des spectres d'absorption permettant d'identifier telle ou telle molécule par comparaison des spectres obtenus à ceux des standards contenus dans une bibliothèque. Les caractéristiques de la chaîne utilisée et le programme d'analyse sont donnés en **annexe 5**. Toutefois, l'environnement moléculaire étant susceptible de modifier l'allure des spectre obtenus, cette technique est sujette aux effets de

matrice, et il est donc souvent nécessaire d'avoir recours à la spectrométrie de masse pour identifier de manière certaines les composés recherchés.

2.5.3 Identification des HAP par GC-MS/MS et analyse semi-quantitative

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est un Trace GC 2000 équipé d'un injecteur vaporisateur à température programmable (PTV), couplé à un spectromètre de masse Polaris-Q à trappe d'ions (Thermo Finnigan Corp., Austin, USA), le tout étant piloté par le logiciel XCalibur (Version 1.2). Le principe de la GC-MS, le système d'injection, la détection par spectroscopie de masse et la description des trappes ioniques sont donnés dans l'**annexe 6**. Dans le cas de notre étude, nous avons utilisé le système GC-MS/MS dans un but de confirmation de l'identité des composés présents dans les extraits. Une analyse semi-quantitative a également été réalisée.

2.5.3.1 Choix de la colonne chromatographique

Les colonnes généralement utilisées dans le cas de la séparation des composés en GC-MS sont des colonnes capillaires en silice fondue avec comme phase stationnaire du 5% phényle 95% diméthylpolysiloxane (colonnes de type DB-5, HP-5, CP-SIL-8 CB, HT-5) [Wang et al. (1999) ; Guillén et al. (2000) ; Nyman et al. (1993) ; Pyle et al. (1997) ; Turrio-Baldassari et al. (2003) ; Chiu et al. (1997) ; Conde et al. (2004) ; Watanabe et al. (2005)]. Cependant certaines colonnes ne permettent pas la séparation de quelques paires critiques de HAP tels que les couples benzo[*a*]anthracène/chrysène, benzo[*b*]fluoranthène/benzo[*k*]fluoranthène et indeno[*1,2,3-cd*]pyrène/dibenzo[*a,h*]anthracène. Il est donc nécessaire que la colonne utilisée puisse permettre une bonne séparation de ces paires critiques, et que le benzo[*g,h,i*]pérylène ne se perde pas dans le bruit de fond susceptible d'être généré par le « *bleeding* » de la colonne aux hautes températures.

La colonne de séparation que nous avons utilisée est une colonne Rtx-5MS (Restek) possédant une phase stationnaire contenant du polysiloxane 95% diméthyl/ 5% diphenyle. Ses caractéristiques sont les suivantes : longueur 30 m, diamètre interne 0.25 mm, et épaisseur de phase stationnaire 0.25 µm.

2.5.3.2 Choix du programme de température du four

Dans le but d'optimiser la séparation des HAP, différentes programmations de température ont été réalisées au niveau du four, en se basant sur les programmes de température reportés dans différentes publications. Certaines modifications ont été faites en tenant compte du type d'appareil utilisé. Nous avons donc fait la synthèse de différents programmes établis par

Guillén et al. (2000), Pyle et al. (1997), Turrio-Baldassari et al. (2003), Nam et al. (2002), Watanabe et al. (2005).

Le programme de température retenu est défini comme suit : température initiale (50°C) maintenue pendant 1.2 min, puis on passe à 180°C à 30°C.min⁻¹ ; la température de 180°C est maintenue pendant 4 min, avant de passer à 270°C avec une rampe de 25°C.min⁻¹ ; après un palier de 14 min à 270°C, on passe à 300°C avec une rampe de 15°C.min⁻¹ ; la température finale de 300°C est maintenue pendant 4 min.

Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium scientifique 6.0 avec un débit constant de 1 mL.min⁻¹, et une pression en tête de colonne de 120 kPa.

2.5.3.3 Conditions d'injection

Le volume de solution injecté est 1 µL (soit manuellement, soit avec un passeur automatique). Les échantillons et les standards sont injectés selon les conditions suivantes : injection en mode PTV *Splitless* avec une température d'entrée de 60°C (durée d'injection 0.2 min), puis on passe à 290°C avec une rampe de 10°C/sec, et 290°C est maintenue pendant 1 min ; s'ensuit alors l'ouverture de la vanne de *Split* après 1 min (débit du *Split* 10 mL.min⁻¹). Le diamètre interne du *Focusliner* (Restek) utilisé comme chambre d'injection en mode PTV est de 5 mm. Après chaque injection, on a une phase de balayage (nettoyage) programmée comme suit : passage de la température à 300°C avec une rampe de 10°C.sec⁻¹, la température de 300°C étant maintenue pendant 3 min avec un débit de 50 mL.min⁻¹. Le débit de purge au niveau du septum est constant.

2.5.3.4 Conditions de détection par spectrométrie de masse

La température de la ligne de transfert entre le GC et le MS a été fixée à 300°C, et la température de la source d'ionisation à 250°C. Les conditions de calibration de l'appareil sont les suivantes : filament d'émission actuel 250 mA à 70eV, et contrôle de gain automatique 50 (unité arbitraire, gamme 1-500).

Pour la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS ou MS²), l'ion parent est sélectionné à $m/z \pm 0.5$, la tension de collision (dissociation induite par collision ou CID) de 1.5 et 2.0 V, et l'énergie d'excitation maximale (q) de 0.30 et 0.45. Les ions parents sont sélectionnés dans le temps comme indiqué dans le **Tableau 2.10**. Parmi toutes ces conditions citées, la valeur de q et la tension de collision sont les paramètres critiques de l'opération MS/MS en trappe d'ions [Nam et Lee. (2002)]. En effet, la tension de collision agit sur l'intensité des pics, tandis que l'énergie d'excitation maximale influe sur la fragmentation des ions.

2.5.3.5 Séparation des HAP

Les temps de rétention des 16 HAP dépendent de la colonne choisie et du programme de température du four. Dans le cas de la colonne utilisée pour notre analyse, la durée totale de l'analyse est de 33.1 min, et les différents temps de rétention des HAP sont consignés dans le **Tableau 2.11**.

Tableau 2.10 : Choix des conditions de mise en œuvre de la GC-MS/MS.

Fenêtre de temps (min)	Ion parent sélectionné (m/z)	Nom du composé	Tension de collision (V)	q	Temps d'isolement (msec)	Temps d'excitation (msec)
0.0 - 5.0	Aucun	Aucun				
5.0 - 6.2	128	Naphtalène				
6.2 - 7.2	152	Acénaphthylène				
7.2 - 8.0	154	Acénaphthène	1.5	0.45	8	15
8.0 - 10.0	166	Fluorène				
10.0 - 12.0	178	Phénanthrène Anthracène				
12.0 - 14.2	202	Fluoranthène Pyrène				
14.2 - 17.0	228	Benzo[a]anthracène Chrysène	2.0	0.45	8	15
17.0 - 21.0	252	Benzo[b]fluoranthène Benzo[k]fluoranthène Benzo[k]fluoranthène				
21.0 - 25.9	276	Benzo[g,h,i]pérylène				
25.9 - 26.7	278	Dibenzo[a,h]anthracène	2.0	0.30	8	15
26.7 - 33.1	276	Indeno[1,2,3-c,d]pyrène				

Tableau 2.11 : Temps de rétention des 16 HAP en GC-MS/MS.

N° du pic	Nom du composé	Temps de rétention (min)	Intervalle de confiance (min)
1	Naphtalène	5.41	± 0.01
2	Acénaphthylène	7.08	± 0.01
3	Acénaphthène	7.36	± 0.01
4	Fluorène	8.32	± 0.01
5	Phénanthrène	10.80	± 0.01
6	Anthracène	10.91	± 0.02
7	Fluoranthène	12.86	± 0.01
8	Pyrène	13.17	± 0.01
9	Benzo[a]anthracène	15.21	± 0.05
10	Chrysène	15.31	± 0.03
11	Benzo[b]fluoranthène	18.27	± 0.14
12	Benzo[k]fluoranthène	18.35	± 0.10
13	Benzo[a]pyrène	19.51	± 0.24
14	Benzo[g,h,i]pérylène	25.74	± 0.56
15	Dibenzo[a,h]anthracène	26.04	± 0.68
16	Indeno[1,2,3-c,d]pyrène	27.55	± 0.27

Une exemple de séparation, obtenu pour une solution étalon de 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans le THF, est donné sur la **Figure 2.4**.

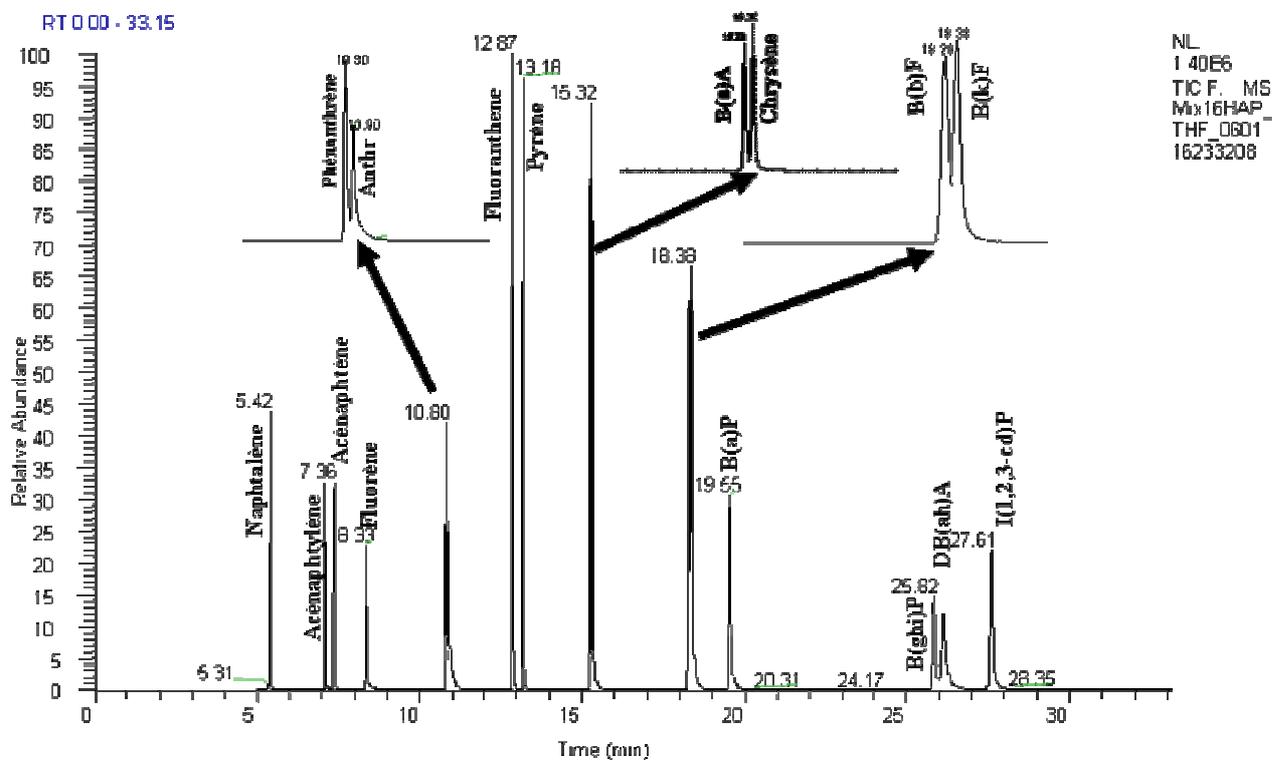


Figure 2.4 : Chromatogramme obtenu à partir d'un étalon (1ppm) par la méthode GC-MS/MS.

2.5.3.6 Identification des HAP par GC-MS/MS

Pour réaliser l'identification par GC-MS/MS, dans un premier temps nous avons contrôlé les valeurs des temps de rétention des pics d'HAP supposés avec celles des temps de rétention des composés de référence (solutions étalons utilisées pour la gamme d'étalonnage) disponibles. Dans un second temps, les spectres de masse en MS/MS ont également été comparés à ceux des 16 HAP élaborés à partir du chromatogramme obtenu par injection de solution étalon contenant les 16 HAP. Cette comparaison de spectres est basée sur deux paramètres importants, à savoir le SI et le RSI. D'après le manuel d'utilisation du logiciel XCalibur, les spectres ne peuvent être identiques que lorsque les valeurs de SI et RSI sont comprises entre 700 et 1000.

2.5.3.7 Quantification par GC-MS/MS

Une analyse semi-quantitative a été faite en utilisant des solutions étalons contenant des concentrations identiques des 16 HAP. Ces solutions étalons sont préparées à partir d'une solution mère contenant les 16 HAP, chacun à la concentration 1 mg.L^{-1} dans le THF. La

gamme de concentrations des solution étalons s'étend de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ à $500 \mu\text{g.L}^{-1}$. Dans le cas de notre étude, nous avons quantifié les différents composés à l'aide d'un étalonnage externe, c'est pourquoi nous préférons utiliser le terme d'analyse semi-quantitative, car un étalonnage interne aurait été plus pertinent pour réaliser une analyse quantitative, afin de s'affranchir d'éventuelles variations lors de l'injection et de la vaporisation. Mais l'objectif de cette analyse n'était pas de quantifier précisément les HAP, ceci ayant déjà été réalisé lors de l'analyse par HPLC-FD ; il s'agissait simplement de confirmer la concentration estimée des HAP une fois ceux-ci identifiés par GC-MS/MS. Un simple étalonnage externe a donc été mis en œuvre, car plus simple et moins long qu'un étalonnage interne.

Nous avons donc tracé des courbes d'étalonnage correspondant à chaque HAP après avoir analysé différentes concentrations de solutions standards (10, 25, 50, 100, 150, 200, 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Ces courbes d'étalonnage sont définies par une équation du type $Y_i = a_i X_i + b_i$ avec Y_i l'aire du pic correspondant et X_i la concentration du composé (i). Elles sont données en **annexe 6**.

• **Chapitre 3:**
***Mise au point de procédures
analytiques pour la
détermination des HAP dans le
café***

3 MISE AU POINT DE PROCEDURES ANALYTIQUES POUR LA DETERMINATION DES HAP DANS LE CAFE

L'étude bibliographique a fait ressortir une grande disparité entre les procédures analytiques reportées à ce jour pour la détermination des HAP, tant dans le café boisson que dans le café moulu. De plus, souvent des étapes de saponification et de partage liquide-liquide sont mises en œuvre, étapes longues, manuelles et consommatrices de grandes quantités de solvants. Par conséquent dans ce travail nous avons envisagé la mise en œuvre de deux techniques d'extraction rapides et peu consommatrices de solvant, à savoir l'extraction en phase solide (SPE) et l'extraction par un solvant chaud sous pression (PSE). La nécessité de réaliser une étape de saponification a également été étudiée. Les résultats sont tout d'abord présentés pour le café moulu, puis ensuite pour le café boisson.

3.1 Détermination des HAP dans le café moulu

Pour le café moulu nous avons choisi de mettre en œuvre l'extraction par un solvant chaud sous pression (PSE), également appelée extraction accélérée par solvant (ASE), car cette méthode s'est imposée depuis quelques années comme la méthode de choix pour l'extraction rapide et semi-automatisée de matrices solides. En effet par rapport à l'autre technique rapide, à savoir l'extraction assistée sous champ micro-ondes, elle présente l'avantage de ne pas nécessiter de filtration de l'extrait obtenu.

Dans un premier temps nous avons étudié diverses voies pour éliminer certains constituants de la matrice présents dans l'extrait, notamment des lipides. Puis nous nous sommes attachés à choisir les conditions d'extraction les mieux adaptées pour notre application. Enfin la procédure analytique choisie a été appliquée à différents cafés moulus.

3.1.1 Choix d'une méthode de purification de l'extrait PSE

La difficulté de l'analyse des HAP dans le café moulu est liée à la présence de nombreux constituants majeurs du café, comme mentionné dans le chapitre 1. Les lipides sont tout particulièrement gênants, car ils sont généralement co-extraits avec les HAP hydrophobes. Par conséquent, il nous a semblé crucial dans un premier temps d'étudier l'étape de purification de l'extrait, afin de parvenir à un extrait purifié permettant une quantification précise et juste des HAP. Nous avons testé plusieurs voies de purification : des adsorbants polaires (silice, alumine) *in situ* ou après l'extraction PSE, un support apolaire (silice greffée octadécyle), et enfin une saponification éthanolique suivie d'une purification sur silice.

3.1.1.1 Purification *in situ* sur alumine

L'alumine est un adsorbant fréquemment utilisé en vue d'une purification *in situ* des extraits (i.e. ajout de l'adsorbant directement dans la cellule d'extraction). Ces essais ont été réalisés dans des conditions classiques de mise en œuvre de la PSE, à savoir extraction avec de l'hexane à 100°C et 2 cycles de 5 min (cf chapitre 2 : expériences ASE-IS 1, 1bis, 2 et 2bis). Les résultats obtenus en terme de taux de récupération sont donnés dans le **Tableau 3.1**.

Tableau 3.1 : Taux de récupération moyens et intervalles de confiance (IC) à 95% pour les trois HAP modèles dans deux cafés moulus dopés après extraction PSE (n = 3).

Conditions expérimentales : (a) reprise du résidu avec 0.5 mL ACN/eau 60/40 (v/v) ; (b) reprise du résidu avec 0.5 mL ACN .

	(a)		(b)	
	Expérience ASE-IS 1		Expérience ASE-IS 2	
	Mélange L'Or		Ethiopie	
	Lot P5 31-12-03 07:37		Réf :06/2004 ; lot 3143101 ; 14 :39	
	Moyenne	IC à 95%	Moyenne	IC à 95%
	(%)	(%)	(%)	(%)
F	82.7	6.0	91.8	2.5
B[b]F	67.8	0.5	47.0	68.2
B[a]P	89.5	28.0	74.0	131.0

On constate une différence dans les résultats selon le café considéré. Ainsi, pour le mélange L'Or, les valeurs observées varient de 67.8 ± 0.5 à $89.5 \pm 28.0\%$ et présentent une répétabilité satisfaisante. Par contre celles obtenues pour le café Ethiopie, en dehors du fluoranthène, sont non répétables. On peut formuler deux hypothèses pour expliquer ces résultats. La première serait un effet de matrice, le café Ethiopie comportant davantage de composés interférents co-extraits, entraînant une mauvaise répétabilité des taux de récupération des HAP. La seconde serait un effet de solvant de reprise, l'acétonitrile (utilisé pour le café Ethiopie) solubilisant davantage de lipides que le mélange eau-acétonitrile (utilisé pour le mélange L'Or). L'inhomogénéité de l'extrait ainsi obtenu peut également être avancée comme explication : on obtient deux phases liquides non miscibles ; seule la phase surnageante a été récupérée afin d'être analysée, et l'on observe de nombreux composés interférents sur les chromatogrammes comme illustré par la **Figure 3.1**. Par ailleurs, on peut supposer que les rendements non quantitatifs sont liés à une extraction insuffisante ; le choix d'une température d'extraction et/ou d'une durée d'extraction plus élevée devrait permettre d'améliorer ces taux de récupération.

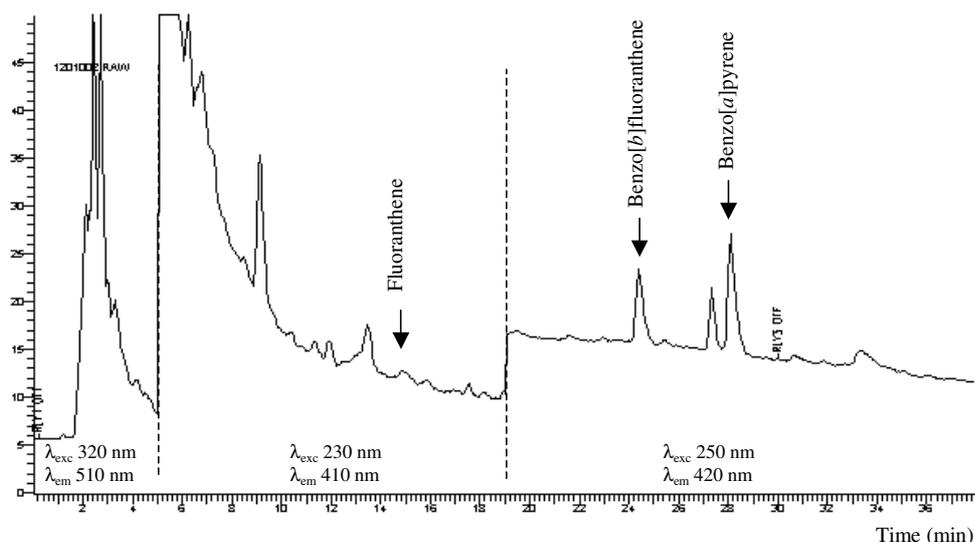


Figure 3.1 : Chromatogramme d'un extrait de café moulu dopé obtenu par PSE (100°C, hexane) et purification *in situ* avec de l'alumine – Café Ethiopie (lot 3143101/06_2004).

Des essais ponctuels ont été menés dans les mêmes conditions sur du café non dopé, avec le méthanol afin d'utiliser un solvant d'extraction polaire (cf chapitre 2 : expériences ASE-IS 3 et 4). Malgré la purification *in situ* sur l'alumine, les extraits finaux obtenus sont beaucoup plus foncés en terme de coloration, ce qui montre la co-extraction de nombreux composés indésirables. Par suite, cette voie de purification a été abandonnée, et nous nous sommes orientés vers une purification de l'extrait recueilli par passage sur cartouche de SPE.

3.1.1.2 Purification par SPE sur silice greffée octadécyle

Les essais précédents ayant révélé la présence dans les extraits d'une phase lipidique, il est possible qu'une partie des HAP reste dans cette phase car les HAP sont très solubles dans la matière grasse. Nous avons donc choisi d'évaporer à sec l'extrait PSE recueilli, puis de reprendre le résidu dans l'acétonitrile, en agitant le tout au vortex afin de favoriser la solubilisation des HAP par le solvant. De plus, nous avons testé un support hydrophobe afin de retenir les lipides co-extraits. La silice greffée octadécyle a donc été choisie. Ces essais ont été réalisés dans des conditions classiques de mise en œuvre de la PSE, à savoir extraction avec de l'hexane à 100°C, mais cette fois avec 3 cycles de 5 min (cf chapitre 2 : expérience ASE-SPE 4). De plus nous avons choisi de tester un mélange hexane/acétone 94/6 (v/v) comme solvant d'extraction pour ces expériences. Les conditions de SPE testées sont celles de l'expérience SPE 2. Dans ces conditions on récupère environ 84.4 (RSD 12.1%), 65.9 (RSD 6.4%) et 22.4% (RSD 12.5%) pour le fluoranthène, le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène.

Pour appréhender les étapes à l'origine des pertes importantes en HAP (i.e. l'extraction PSE, l'étape d'évaporation/reprise dans l'acétonitrile, ou l'étape de SPE sur silice), nous avons réalisé le même type d'expérience, mais cette fois en effectuant le dopage en HAP après l'extraction PSE (cf chapitre 2 : expérience ASE-SPE 4bis). Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 3.2**. On récupère dans ces conditions 81.5 (RSD 3.6%), 56.0 (RSD 14.3%) et 27.5% (RSD 13.0%) pour le fluoranthène, le benzo[*b*]fluoranthène et le benzo[*a*]pyrène.

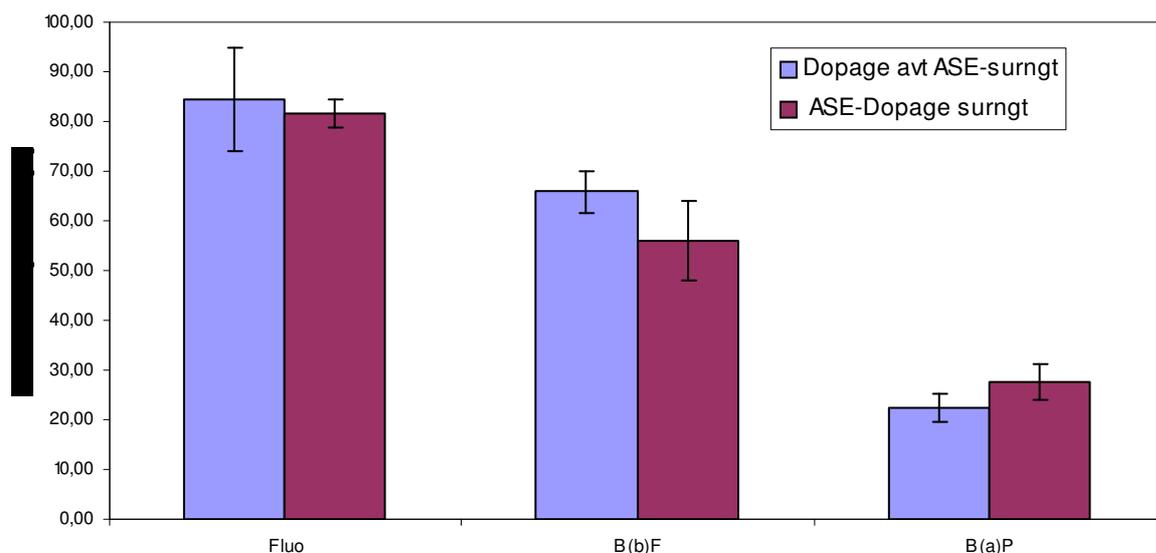


Figure 3.2 : Taux de récupération moyen des 3 HAP modèles analysés dans la fraction 1 recueillie après SPE sur silice greffée C18. Le dopage en HAP a été effectué soit sur le café moulu avant son extraction PSE, soit sur l'extrait PSE recueilli après extraction PSE de café moulu non dopé ($n = 3$, valeurs moyennes \pm écarts-types).

Ces résultats mettent donc en cause soit l'étape de reprise par l'acétonitrile de l'extrait PSE concentré (une partie des HAP pouvant rester dans la phase lipidique), soit l'étape de purification sur silice greffée octadécyle, dans la perte conséquente en HAP observée, tout particulièrement pour le benzo[*a*]pyrène. Dans ce dernier cas, il est raisonnable de penser soit à une saturation du support par des constituants du café co-extraits, soit à un entraînement des HAP par l'acétonitrile lors du passage de l'extrait. Dans cette dernière hypothèse, une diminution du volume de l'extrait et/ou l'utilisation d'un solvant moins éluant devrait permettre de limiter ces pertes en HAP.

Par conséquent nous avons effectué des essais complémentaires en SPE avec du solvant dopé en HAP, afin de s'affranchir des constituants du café. Nous avons tout d'abord testé l'effet du

volume d'échantillon percolant au travers de la cartouche SPE, en conservant l'acétonitrile comme solvant (cf chapitre 2 : expérience SPE 2). Ensuite nous avons considéré le mélange ACN/eau 50/50 (v :v) comme solvant d'échantillon (cf chapitre 2 : expérience SPE 3). Les résultats sont représentés graphiquement sur la **Figure 3.3**.

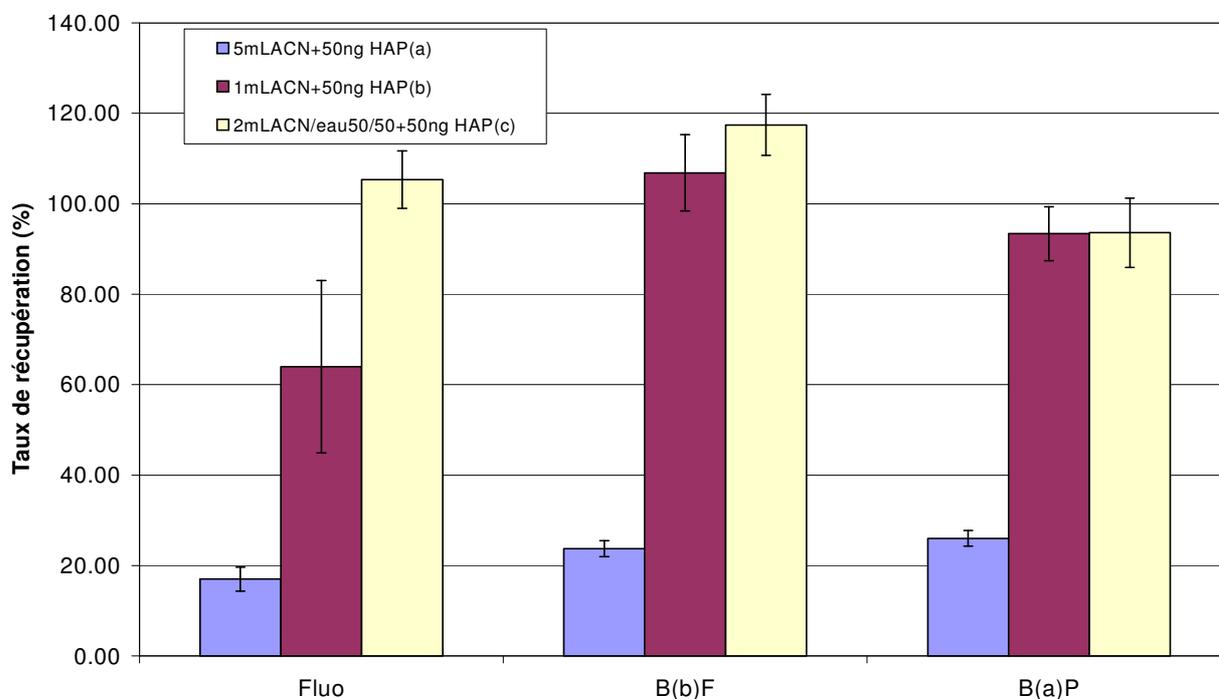


Figure 3.3 : Taux de récupération moyen des 3 HAP modèles après percolation sur cartouche de silice greffée octadécyle d'un volume donné de solvant dopé ($n = 3$, valeurs moyennes \pm écarts-types).

Lors du passage de 5 mL d'acétonitrile dopé, on ne récupère que 17.0% de fluoranthène (RSD 15.6%), 23.7% de benzo[*b*]fluoranthène (RSD 7.4%) et 26.0% de benzo[*a*]pyrène (RSD 6.7%). Il est donc nécessaire de diminuer le volume d'acétonitrile, et/ou d'utiliser un solvant de force éluante plus faible, tel que le mélange ACN/eau 50/50 (v/v). Ainsi, lorsque seulement 1 mL d'acétonitrile est percolé au travers de la cartouche, les résultats sont nettement améliorés avec récupération de 64.0% du fluoranthène (RSD 29.8%), 106.8% du benzo[*b*]fluoranthène (RSD 7.9%) et 93.4% du benzo[*a*]pyrène (RSD 6.4%). Toutefois une partie des HAP est entraînée par l'acétonitrile au travers de la cartouche, et le passage sur une seconde cartouche permet de récupérer 23.8% (RSD 20.6%) du fluoranthène, 6.8% (RSD 48.2%) du benzo[*b*]fluoranthène et 5.5% (RSD 35.5%) du benzo[*a*]pyrène. Par suite, pour limiter l'entraînement des HAP nous avons choisi le mélange ACN/eau 50/50 (v/v) comme solvant d'échantillon, avec un volume de 2 mL. Dans ce cas on a obtenu 105.3% de fluoranthène (RSD 6.0%), 117.4% de benzo[*b*]fluoranthène (RSD 5.7%) et 93.6% de

benzo[*a*]pyrène (RSD 8.2%). Les résultats sont donc à la fois quantitatifs et répétables dans ces conditions.

Nous avons donc testé ces conditions de purification SPE sur un nouvel échantillon de café de Colombie (lot-03-334) (cf chapitre 2 : expériences ASE-SPE 5 et 5 bis). Après évaporation à sec de l'extrait PSE, le résidu est repris avec 2 mL d'ACN/eau 50/50 (v/v) avant d'être purifié sur silice greffée octadécyle. Dans ces conditions on récupère après élution 107.9% de fluoranthène (RSD 5.6%), 103.7% de benzo[*b*]fluoranthène (RSD 18.3%) et 57.9% de benzo[*a*]pyrène (RSD 19.8%). Les résultats pour ce dernier composé sont insuffisants, peut-être en raison d'une mauvaise extraction PSE du café moulu dopé dans les conditions choisies ou d'une solubilisation de celui-ci dans la phase lipidique. D'autre part, de nombreux composés interférents subsistent et gênent la détermination des HAP comme l'illustre le chromatogramme présenté sur la **Figure 3.4**.

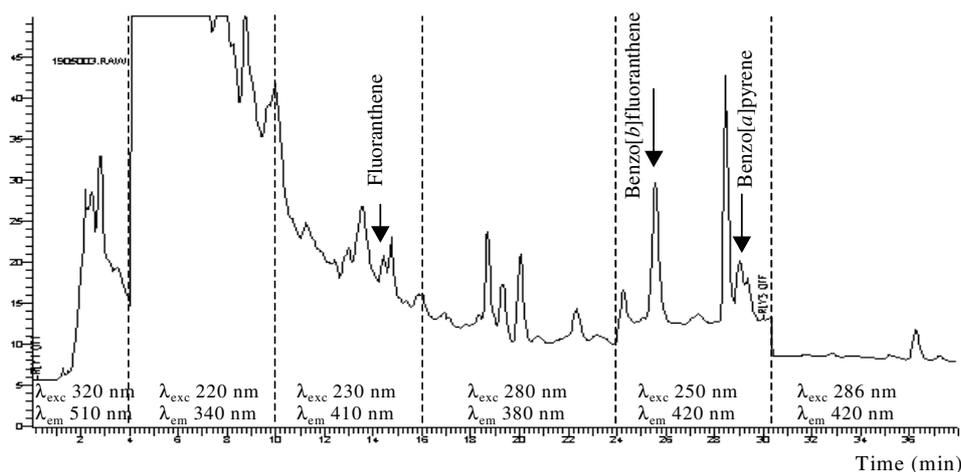


Figure 3.4 : Chromatogramme d'un extrait de café moulu dopé obtenu par PSE (100°C, hexane/acétone 94/6 (v/v)) et purification sur cartouche de silice greffée octadécyle – Café Colombie (lot 03334).

Par suite, d'autres voies de purification ont été testées, tel le passage sur cartouche SPE remplie de silice.

3.1.1.3 Purification par SPE sur silice

Ces expériences ont été menées avec du café moulu de Colombie (lot-03-259), dopé et non dopé. L'hexane a été choisi à nouveau comme solvant d'extraction, mais cette fois en le chauffant à 120 et 150°C pour améliorer les taux de récupération insuffisants obtenus précédemment à 100°C (cf chapitre 2 : expériences ASE-SPE 1, 1bis et 2). Après

concentration des extraits PSE obtenus, une purification sur cartouche de silice est réalisée. Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau 3.2** et représentés sur la **Figure 3.5**.

Tableau 3.2 : Taux de récupération moyens (et écarts-types relatifs) dans chaque fraction d'élution pour les trois HAP modèles dans du café moulu après extraction PSE et purification sur silice.

Conditions expérimentales : concentration des extraits PSE jusqu'à environ 5 mL avant passage sur silice (1 g) ; élution avec 2 fractions : 2 x 2.5 mL d'hexane, puis 2 x 2 mL d'hexane/dichlorométhane 50/50 (v/v) ; chacune des fractions d'élution est évaporée à sec, puis reprise avec 1 mL d'acétonitrile avant analyse.

	Café moulu de Colombie dopé				Extrait PSE dopé (extrait de café de Colombie)	
	Expérience ASE-SPE 2 + SPE 1		Expérience ASE-SPE 1bis + SPE 1		Expérience ASE-SPE 3 + SPE 1	
	PSE : 150°C / Hexane		PSE : 120°C / Hexane		PSE : 120°C / Hexane	
	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 1	Fraction 2
	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)
F	74.4 (18.3)	15.9 (16.8)	97.2 (9.1)	0.49 (0.0)	84.6 (20.8)	11.3 (98.7)
B[b]F	33.4 (5.1)	20.0 (18.4)	26.3 (5.8)	8.8 (8.7)	48.8 (14.7)	4.0 (57.3)
B[a]P	20.9 (2.4)	5.9 (5.8)	22.3 (1.8)	9.7 (2.9)	23.5 (12.9)	3.1 (53.9)

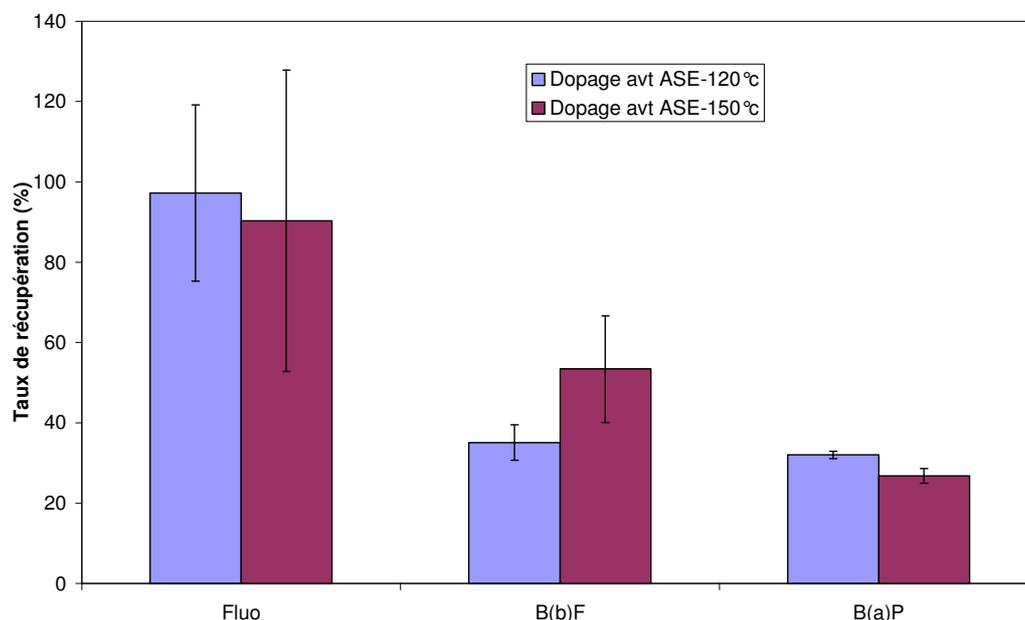


Figure 3.5 : Taux de récupération moyens (somme des 2 fractions d'élution) des 3 HAP modèles dans le café moulu dopé, après extraction PSE à deux températures différentes suivie d'une purification sur cartouche de silice (n = 3, valeurs moyennes ± intervalles de confiance à 95%).

Toutes les valeurs obtenues sont globalement répétables. Quant aux taux de récupération, s'ils sont quantitatifs pour le fluoranthène aux deux températures testées (97.2 ± 21.9 et $90.3 \pm$

37.5% à 120 et 150°C respectivement), les valeurs pour les deux autres HAP sont très insuffisantes. Pour le benzo[*b*]fluoranthène, une augmentation de la température d'extraction permet d'améliorer significativement le taux de récupération (passage de 35.1 ± 4.4 à $53.4 \pm 13.3\%$). Par contre, la récupération du benzo[*a*]pyrène reste partielle, que ce soit à 120 ou 150°C (32.0 ± 0.9 et $26.6 \pm 1.8\%$ respectivement). Un exemple de chromatogramme pour un échantillon de café moulu dopé est donné sur la **Figure 3.6**. On note la présence de nombreux composés interférents peu hydrophobes puisqu'ils apparaissent aux faibles temps de rétention sur une colonne de silice greffée octadécyle.

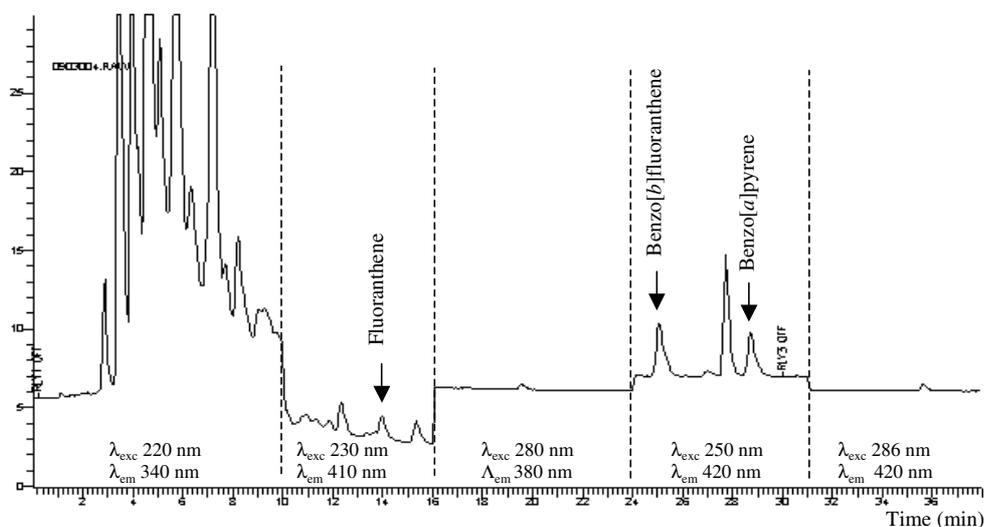


Figure 3.6 : Chromatogramme d'un extrait de café moulu dopé obtenu extrait par PSE (150°C, hexane) et purification sur cartouche de silice – Café Colombie (lot 03259).

Les pertes observées peuvent être imputables, soit à une extraction PSE insuffisante, soit à des pertes lors de la purification sur silice. Pour connaître l'origine de ces pertes, une expérience complémentaire a été menée dans les mêmes conditions (i.e. 120°C), mais en réalisant le dopage en HAP après l'extraction PSE (cf chapitre 2 : expérience ASE-SPE 3). Les résultats, indiqués dans le **Tableau 3.2** et illustrés sur la **Figure 3.7**, ne sont pas significativement différents des précédents.

Par conséquent les pertes observées pour les deux HAP les plus hydrophobes sont dues à l'étape de purification sur silice. On peut émettre plusieurs hypothèses pour expliquer ces résultats : (1) une saturation du support solide par des constituants du café co-extraits, (2) un entraînement des HAP les plus hydrophobes au travers du support par interaction avec certains composés du café (ex : rétention dans la phase lipidique, complexation avec la

caféine). Aussi avons-nous testé l'étape de saponification en amont de la purification sur silice afin de minimiser la présence de composés interférents.

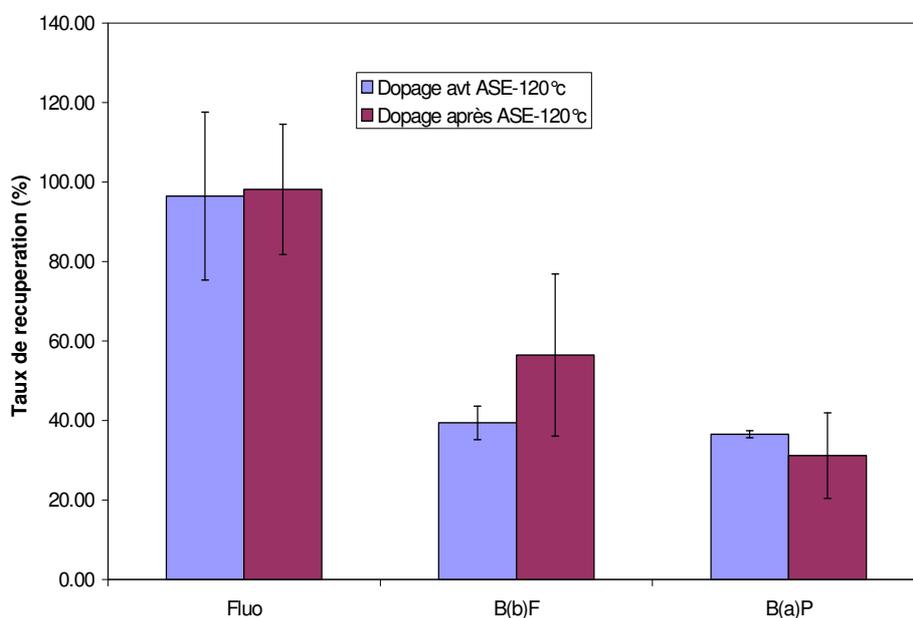


Figure 3.7 : Taux de récupération moyens des 3 HAP modèles rajoutés soit avant la PSE (dopage du café moulu), soit après la PSE (dopage de l'extrait recueilli) ; dans les deux cas une purification est effectuée sur cartouche de silice ($n = 3$, valeurs moyennes \pm intervalles de confiance à 95%).

3.1.1.4 Purification par saponification et partage liquide-liquide

Plusieurs articles mentionnent la saponification comme étant une étape importante pour l'élimination de la phase lipidique contenue dans les extraits [Hischenhuber et Stijve (1987) ; De Kruijf et al. (1987b); Camargo et Toledo (2002)]. C'est pourquoi nous avons choisi de la mettre en œuvre pour l'extrait PSE de café moulu. Cette étape est suivie d'une extraction par partage liquide-liquide dans le cyclohexane, afin d'éliminer la fraction saponifiable. Les HAP sont récupérés dans la fraction insaponifiable.

Outre l'allongement de la durée de traitement de l'échantillon, l'ajout d'une nouvelle étape à celles déjà existantes pourrait conduire à des pertes en HAP. Il est donc important de tester cette nouvelle étape. Pour cela nous avons réalisé dans un premier temps cette étape sur un extrait PSE obtenu à partir de café moulu non dopé, et le dopage en HAP a été effectué dans l'extrait juste avant la saponification. Des expériences complémentaires ont également été réalisées en effectuant le dopage après la saponification, soit juste avant la purification sur silice, soit juste avant l'évaporation finale (cf chapitre 2 : expériences DOP 1, 2 et 3). Les taux

de récupération obtenus sont indiqués dans le **Tableau 3.3** et représentés sur la **Figure 3.8**. Les résultats pour l'acénaphthène et le fluorène sont donnés à titre purement indicatif, mais ils ne sont pas valides en raison d'interférents biaisant leur quantification.

Tableau 3.3 : Taux de récupération moyens (et écarts-types relatifs) dans des extraits PSE de café Colombie pour lesquels le dopage a été fait ultérieurement, soit juste avant concentration et saponification, soit juste avant la SPE sur silice, soit juste avant l'évaporation finale (n = 2).

* Les résultats pour l'acénaphthène et le fluorène sont donnés à titre indicatif.

	Dopage avant concentration de l'extrait PSE	Dopage juste avant la SPE sur silice	Dopage juste avant l'évaporation finale
	Expérience DOP 1	Expérience DOP 2	Expérience DOP 3
	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)
Ace*	51.7 (25.0)	157.5 (0.7)	108.4 (1.0)
Fluorene*	34.2 (26.7)	46.2 (8.4)	22.6 (1.1)
Phen	116.5 (20.4)	115.1 (6.3)	99.1 (5.5)
Anthr	76.4 (19.3)	92.2 (1.6)	79.0 (1.2)
F	91.1 (1.4)	102.5 (3.0)	101.5 (25.2)
Pyr	105.2 (13.9)	87.3 (6.4)	100.6 (9.9)
B[a]A	90.9 (9.1)	89.4 (5.9)	103.7 (3.3)
Chrys	84.6 (1.4)	80.9 (12.9)	82.2 (7.4)
B[b]F	85.8 (1.3)	89.9 (2.1)	96.4 (7.4)
B[k]F	87.3 (2.6)	89.0 (2.7)	98.0 (5.8)
B[a]P	80.9 (2.0)	83.1 (5.1)	91.1 (6.5)
DB[ah]A	78.5 (3.0)	82.2 (10.8)	93.2 (8.6)
B[ghi]P	82.4 (0.3)	91.7 (1.3)	97.6 (7.0)

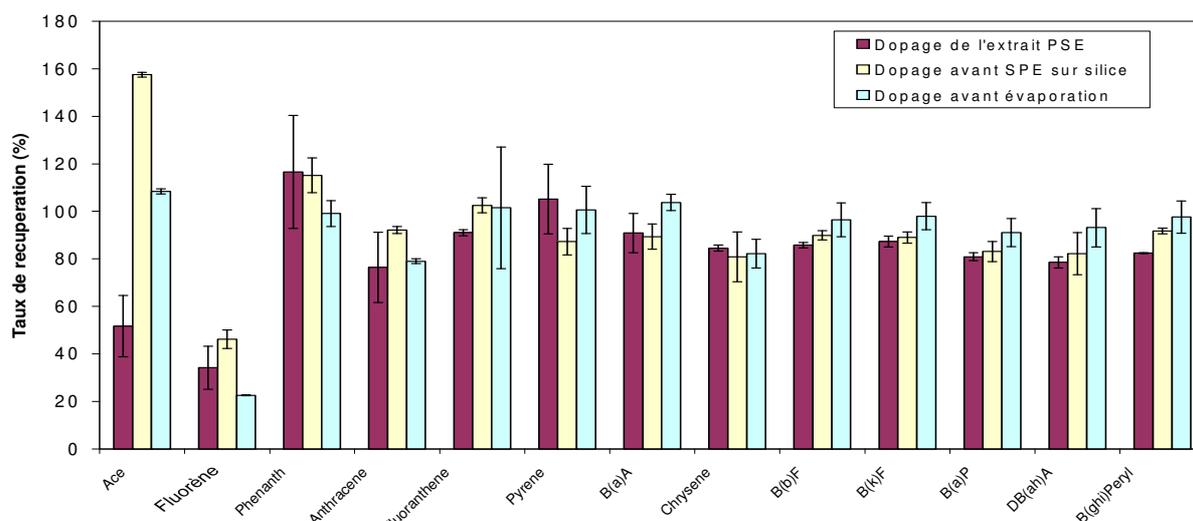


Figure 3.8 : Taux de récupération moyens des HAP après extraction PSE de café moulu, et dopage à différentes étapes de la procédure analytique (n = 2, valeurs moyennes ± écarts-types).

Les résultats du dopage réalisé après la SPE, juste avant l'étape d'évaporation finale à sec, présentent de très bons rendements pour les HAP à 4 et 5 cycles aromatiques (91.1 à 103.7%), en dehors du chrysène où nous n'avons que 82.2%. Pour l'anthracène, constitué de 3 cycles avec une structure linéaire, on observe également environ 20% de pertes. En revanche, pour le phénanthrène, également à 3 cycles mais de forme angulaire, la récupération est quantitative. En conclusion, l'étape d'évaporation entraîne des pertes importantes pour les HAP à 3 cycles et structure linéaire, et de légères pertes (2 à 7%) pour les HAP à 4 et 5 cycles.

Concernant le dopage juste avant la SPE, les HAP sont soumis à deux étapes successives, la SPE et l'évaporation à sec. Les rendements de récupération des HAP à 4 et 5 cycles aromatiques varient de 80.9 (chrysène) à 102.5% (fluoranthène) ; on constate environ 10-15% de pertes imputables à l'étape de SPE, ce qui pourrait résulter d'un volume d'élution insuffisant pour récupérer la totalité de ces molécules. Pour ceux à 3 cycles, on a de nouveau une récupération quantitative du phénanthrène, alors qu'environ 8% de pertes sont observées pour l'anthracène.

Pour le dopage juste après la PSE, les HAP sont soumis à une première étape d'évaporation à sec, à la saponification, à l'extraction liquide-liquide, à une deuxième évaporation, à la SPE et à une troisième évaporation (à sec). On a donc 6 étapes importantes au cours desquelles nous pouvons facilement perdre des HAP. Pour les HAP à 4 et 5 cycles aromatiques, les rendements de récupération varient de 78.5 (dibenzo[*a,h*]anthracène) à 105.2%(pyrène). Pour les HAP à 3 cycles, des pertes (environ 24%) sont toujours observées pour l'anthracène.

En conclusion on constate que, mis à part l'anthracène et le chrysène, les taux de récupération sont quantitatifs après la seule étape d'évaporation finale. Les résultats sont également acceptables après la purification sur silice, même si l'on observe entre 10 à 20% en moyenne de pertes pour la majorité des HAP. Quant à l'étape de saponification suivie du partage liquide-liquide, les récupérations sont satisfaisantes, puisque les résultats ne sont pas significativement différents de ceux obtenus précédemment. En outre la phase lipidique a été éliminée des extraits, et l'allure des chromatogrammes est satisfaisante comme cela est illustré ultérieurement.

3.1.1.5 Conclusion

Au vu de tous ces résultats, il apparaît que l'étape de saponification est importante afin d'éliminer une grande partie des lipides co-extraits durant la PSE. De plus, après la récupération de la fraction insaponifiable dans un solvant organique, il est nécessaire de

purifier sur cartouche SPE remplie de silice afin d'éliminer encore des composés interférents. C'est donc cette voie de purification qui a été choisie au final pour la suite de notre étude. Nous avons ensuite étudié les conditions d'extraction PSE.

3.1.2 Choix des conditions de mise en œuvre de l'extraction PSE

Plusieurs paramètres sont à prendre en considération pour optimiser les conditions de mise en œuvre de l'extraction par un solvant chaud sous pression : la nature du solvant d'extraction, la température du four, la durée de l'extraction, et dans une moindre mesure la pression dans la cellule (celle-ci devant être suffisante pour maintenir le solvant chaud à l'état liquide). Ainsi, l'influence de ces paramètres sera étudiée sur la concentration moyenne des HAP dans le café moulu dopé, et la teneur en HAP natifs estimée dans le café moulu non dopé.

3.1.2.1 Choix du solvant d'extraction

Le choix du solvant est très important car il doit pouvoir assurer la solubilisation des solutés à extraire, tout en étant suffisamment sélectif pour éviter la co-extraction de constituants de la matrice de café. De plus, ce solvant doit avoir une faible température d'ébullition pour limiter la durée de l'étape d'évaporation du solvant lors de la concentration de l'extrait, afin d'éviter des pertes importantes en composés les plus volatils. Plusieurs solvants ont été testés : hexane, hexane/acétone 50/50 (v/v), acétone et méthanol. Ces expériences ont été effectuées pour une température d'extraction fixée à 100°C (cf chapitre 2 : expériences SAP 2 à SAP 5). Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau 3.4** et illustrés graphiquement sur la **Figure 3.9**. Les résultats obtenus pour l'acénaphène et le fluorène ne sont pas discutés, car la quantification de ces composés est incertaine en raison de la présence de composés interférents.

L'utilisation de l'hexane conduit à l'obtention de faibles taux de recouvrement, variant de 39.3 (phénanthrène) à 69.4% (pyrène). Ces résultats ne sont pas satisfaisants, d'autant que la précision des résultats est médiocre avec des écarts-types relatifs s'étendant entre 3.6 et 96.6%. Ceci peut être étroitement lié à la non polarité de ce solvant. A l'inverse nous avons donc testé le méthanol. Le méthanol permet d'avoir des taux de recouvrement légèrement meilleurs, allant de 47.2 (benzo[k]fluoranthène) à 100.4% (pyrène). Cependant la précision des résultats demeure insuffisante, les écarts-types relatifs s'échelonnant entre 15.5 et 127.8%; cela peut être dû à la présence de certains composés indésirables co-extraits par ce solvant, qui gênent la quantification des HAP. L'acétone permet d'atteindre une meilleure précision avec des taux de recouvrement variant de 36.9 (phénanthrène) à 91.2% (fluoranthène). Néanmoins l'extrait obtenu après concentration est très coloré, en raison

d'une faible sélectivité de ce solvant. Le mélange hexane/acétone 50/50 (v/v) offre un extrait plus clair, tout en assurant des taux de recouvrement relativement similaires (de 57.5 (anthracène) à 83.3% (pyrène)). En outre avec ce solvant la précision est satisfaisante (RSD variant de 3.3 à 19.1%).

Tableau 3.4 : Influence du solvant d'extraction sur les taux de récupération moyens (et écarts-types relatifs) après extraction PSE (100°C) de café moulu de Colombie dopé, suivie d'une saponification, partage liquide-liquide et purification sur silice (n = 2 sauf pour l'hexane/acétone 94/6 où n = 1).

* Les résultats pour l'acénaphthène et le fluorène sont donnés à titre indicatif.

	Nature du solvant d'extraction PSE				
	Acétone	MeOH	n-Hexane	Hexane/acétone 94/6	Hexane/acétone 50/50
	Expérience SAP 5	Expérience SAP 4	Expérience SAP 2	Expérience SAP 1	Expérience SAP 3
	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)	Rendement (%)	Moyenne (%) (RSD %)
<i>Ace*</i>	39.1 (40.9)	24.0 (10.0)	33.5 (28.0)	40.6	40.1 (1.8)
<i>Fluorene*</i>	37.1 (14.7)	6.9 (10.7)	38.2 (20.2)	12.0	47.6 (0.9)
Phen	36.9 (111.1)	48.7 (93.3)	39.3 (96.6)	49.4	57.9 (15.6)
Anthr	60.5 (3.9)	52.0 (28.2)	45.5 (22.3)	36.1	57.5 (6.7)
F	91.2 (32.4)	66.1 (127.8)	57.6 (17.7)	42.8	82.0 (19.1)
Pyr	48.1 (25.5)	100.4 (38.2)	69.4 (35.8)	47.9	83.3 (5.7)
B[a]A	81.3 (7.7)	71.0 (22.7)	51.1 (9.5)	55.7	64.2 (5.5)
Chrys	68.5 (9.4)	57.8 (28.1)	43.1 (9.7)	50.5	60.7 (5.1)
B[b]F	80.0 (2.4)	63.5 (21.6)	53.2 (12.9)	51.2	67.7 (5.3)
B[k]F	81.7 (1.9)	47.2 (28.4)	54.4 (10.7)	49.7	68.9 (4.4)
B[a]P	81.1 (2.1)	70.1 (18.9)	52.8 (12.9)	47.3	66.6 (5.2)
DB[ah]A	82.7 (6.9)	68.0 (16.1)	49.7 (3.6)	46.6	66.4 (3.3)
B[ghi]P	88.3 (6.2)	72.7 (15.5)	50.5 (4.0)	47.2	70.9 (4.1)

Nous avons réalisé une expérience complémentaire avec un mélange hexane/acétone 94/6 (v/v) (cf chapitre 2 : expérience SAP 1), le pourcentage d'acétone ayant été diminué pour essayer de minimiser la co-extraction de composés interférents. Les résultats obtenus sont donnés dans le **Tableau 3.4** et représentés sur la **Figure 3.10**.

Comparativement aux rendements observés avec le mélange hexane/acétone 50/50 (v/v), les taux de recouvrement obtenus avec le mélange hexane/acétone 94/6 (v/v) sont relativement faibles. Ceci est en accord avec de précédentes études reportant le mélange hexane/acétone 50/50 (v/v) comme le plus approprié pour l'extraction des HAP dans les matrices solides.

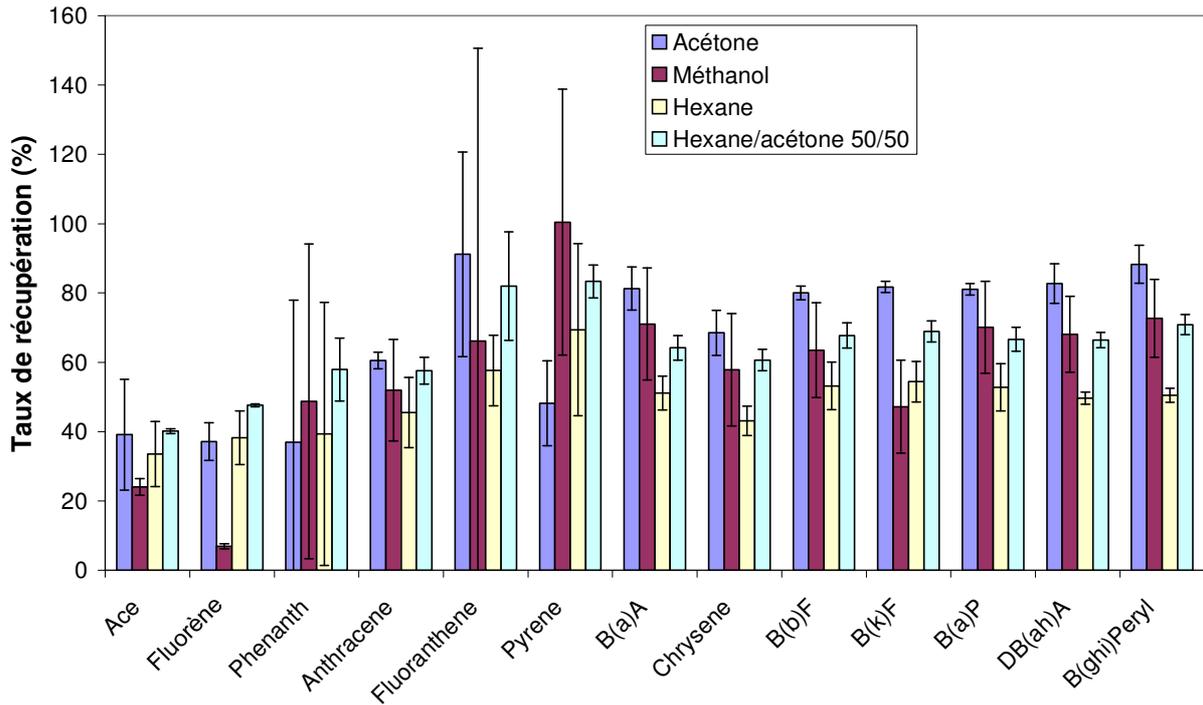


Figure 3.9 : Influence de la nature du solvant d'extraction PSE sur les taux de récupération moyens des HAP dans le café moulu dopé (n = 2, valeurs moyennes ± écarts-types).

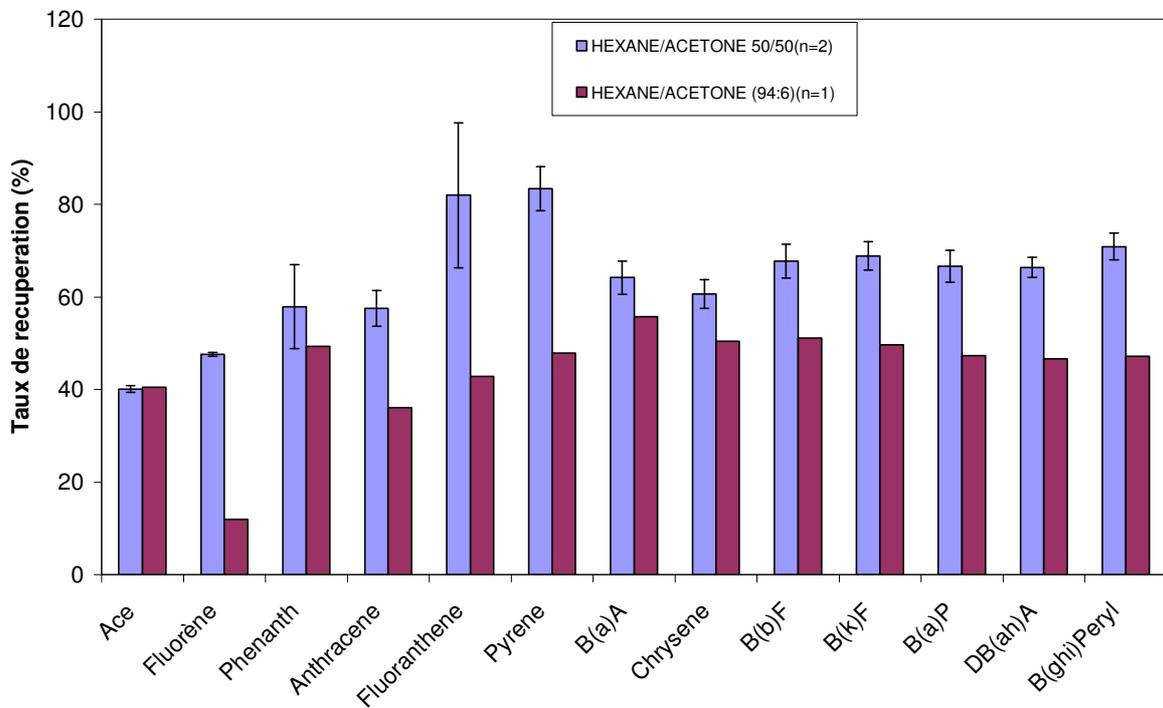


Figure 3.10 : Influence de la composition du mélange hexane/acétone utilisé en PSE sur les taux de récupération moyens des HAP dans le café moulu dopé (n = 2 pour hexane-acétone 50/50, valeurs moyennes ± écarts-types).

3.1.2.2 Choix de la température d'extraction

La température est le paramètre le plus important avec la technique PSE. Son augmentation permet d'élever les coefficients de diffusion et la solubilité des analytes dans le solvant, et de diminuer la viscosité de celui-ci. Elle favorise aussi la désorption des composés de la matrice. Ainsi, son choix paraît très déterminant dans le processus d'extraction.

Pour étudier l'effet de la température nous avons maintenu toutes les autres conditions de la PSE constantes (ex : mélange hexane/acétone 50/50 (v/v)). Trois températures ont été testées : 100, 120 et 150°C (cf chapitre 2 : expériences SAP 3, 6 et 7). Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **Tableau 3.5** et représentés graphiquement sur la **Figure 3.11**.

Tableau 3.5 : Influence de la température d'extraction sur les taux de récupération moyens (et écarts-types relatifs) après extraction PSE (avec de l'hexane-acétone 50/50 v/v) de café moulu de Colombie dopé, suivie d'une saponification, partage liquide-liquide et purification sur silice (n = 2).

* Les résultats pour l'acénaphène et le fluorène sont donnés à titre indicatif.

	Température d'extraction PSE		
	100°C	120°C	150°C
	Expérience SAP 3	Expérience SAP 6	Expérience SAP 7
	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)
Ace*	40.1 (1.8)	88.4 (46.0)	35.6 (9.4)
Fluorene*	47.6 (0.9)	46.3 (24.3)	17.8 (18.4)
Phen	57.9 (15.6)	57.2 (2.2)	101.9 (9.2)
Anthr	57.5 (6.7)	72.3 (1.1)	63.9 (12.4)
F	82.0 (19.1)	102.2 (2.7)	100.6 (7.7)
Pyr	83.3 (5.7)	90.1 (9.0)	81.8 (11.4)
B[a]A	64.2 (5.5)	96.3 (3.2)	99.4 (4.4)
Chrys	60.7 (5.1)	86.1 (2.8)	106.1 (6.8)
B[b]F	67.7 (5.3)	65.1 (1.2)	81.0 (3.3)
B[k]F	68.9 (4.4)	65.5 (1.7)	76.5 (1.4)
B[a]P	66.6 (5.2)	65.0 (2.8)	78.6 (7.8)
DB[ah]A	66.4 (3.3)	57.4 (2.7)	70.3 (1.5)
B[ghi]P	70.9 (4.1)	65.1 (4.4)	74.7 (3.2)

A nouveau, pour des problèmes de quantification, nous avons exclu les deux premiers composés (acénaphène et fluorène) pour mieux expliquer l'influence de la température.

Les meilleurs résultats sont observés pour une température de 150°C, avec des taux de récupération variant entre 63.9 (anthracène) et 106.1% (chrysène), et une précision acceptable (RSD inférieurs à 13%). Dans le cas présent, l'augmentation de la température améliore

surtout le rendement d'extraction des composés à 4 et 5 cycles (i.e. benzo[*a*]anthracène, chrysène, benzo[*b*]fluoranthène, benzo[*k*]fluoranthène, benzo[*a*]pyrène et dibenzo[*a,h*]-anthracène). Ces résultats sont en accord avec d'autres études ayant montré que l'augmentation de température favorise l'extraction des HAP [Yusa et al. (2005) ; Jánská et al. (2004)].

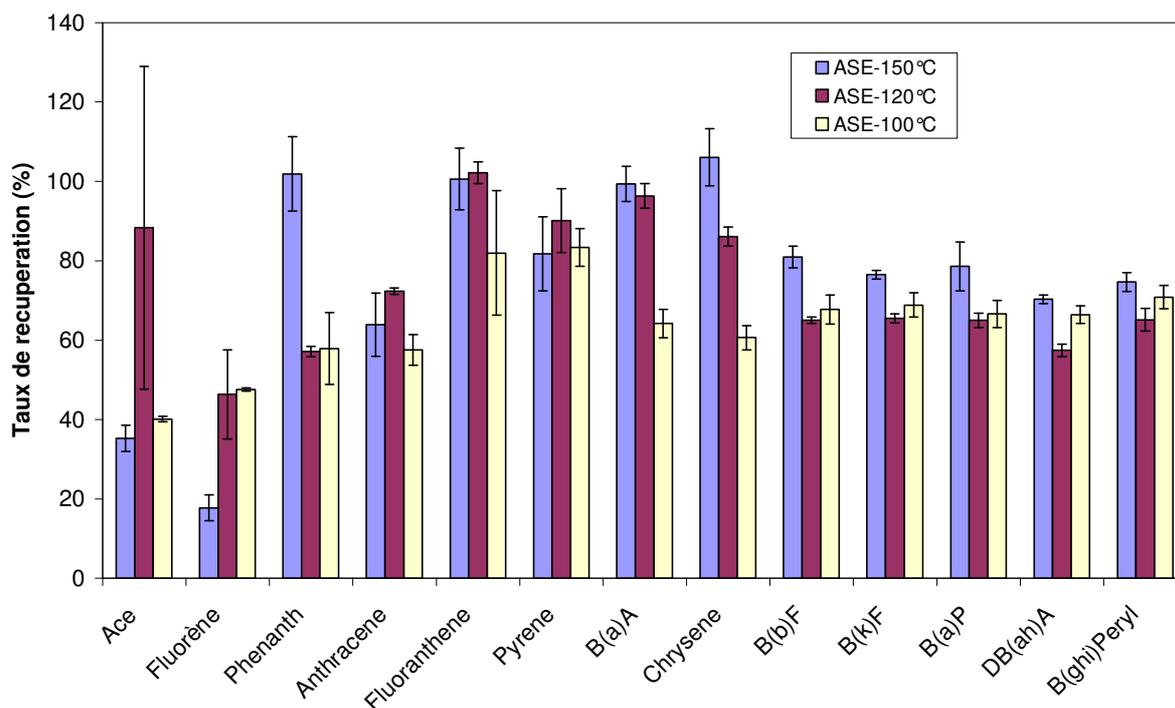


Figure 3.11 : Influence de la température d'extraction en PSE sur les taux de récupération moyens des HAP dans le café moulu dopé ($n = 2$, valeurs moyennes \pm écarts-types).

Il est intéressant de constater que les taux de récupération sont globalement identiques à ceux que nous avons précédemment obtenus en effectuant le dopage en HAP directement dans l'extrait PSE recueilli (voir **Tableau 3.3**). Ceci fait apparaître l'efficacité de l'extraction PSE dans ces conditions, et souligne l'influence des étapes ultérieures de traitement de l'échantillon sur les pertes observées.

3.1.2.3 Conclusion

Les essais menés sur des échantillons de café moulu dopés ont permis de retenir pour l'extraction PSE le mélange hexane/acétone 50/50 (v/v) comme solvant et une température d'extraction de 150°C. Les autres conditions fixées sont 5 min de chauffage, 120 sec de purge, volume de rinçage (*flush volume*) de 140%, 5 min d'extraction statique, et 3 cycles.

3.1.3 Intérêt de la mise en œuvre d'une extraction PSE

Pour justifier l'intérêt de mise en œuvre de la technique PSE nous avons réalisé deux types d'expériences : l'une avec une extraction du café moulu par la technique classique du Soxhlet (suivie d'une saponification de l'extrait obtenu et d'une purification sur silice), l'autre en effectuant directement la saponification sur le café moulu (i.e. sans extraction préalable des composés recherchés).

3.1.3.1 Comparaison avec une extraction classique par Soxhlet

Pour réaliser l'extraction par Soxhlet, nous sommes partis d'une prise d'essai plus importante que pour la PSE (i.e. 15 au lieu de 5 g), en conservant la même concentration en dopage pour chacun des HAP. Nous avons choisi de mettre en œuvre les conditions détaillées dans l'article de De Kruijf et al. (1987b), à savoir une extraction par l'acétone pendant 6 h. L'extrait recueilli est ensuite soumis au même traitement de purification que l'extrait PSE, soit une saponification, suivie d'un partage liquide-liquide et d'une purification sur silice, afin d'avoir des traitements comparables. Les résultats sont donnés dans le **Tableau 3.6** et présentés sur la **Figure 3.12**.

Tableau 3.6 : Taux de récupération des HAP dans le café de Colombie moulu dopé, après extraction par Soxhlet (suivie d'une saponification, partage liquide-liquide et purification sur silice) ou après saponification directe (suivie d'un partage liquide-liquide et d'une purification sur silice) (n = 2 pour le Soxhlet, n = 3 pour la saponification directe).

* Les résultats pour l'acénaphène et le fluorène sont donnés à titre indicatif.

	Soxhlet	Saponification directe
	Moyenne (%) (RSD %)	Moyenne (%) (RSD %)
Ace*	46.1 (3.1)	40.9 (11.7)
Fluorene*	44.6 (46.3)	34.8 (18.6)
Phen	218.5 (16.2)	63.8 (11.8)
Anthr	78.9 (7.1)	69.8 (3.4)
F	66.2 (139.9)	48.7 (7.2)
Pyr	77.7 (48.3)	69.3 (6.3)
B[a]A	80.3 (4.6)	80.6 (1.4)
Chrys	69.9 (4.7)	84.1 (2.4)
B[b]F	80.7 (1.3)	75.2 (2.5)
B[k]F	86.0 (2.5)	74.6 (1.7)
B[a]P	78.3 (2.4)	71.2 (1.9)
DB[ah]A	76.4 (0.1)	73.7 (1.7)
B[ghi]P	76.2 (1.5)	73.8 (2.9)

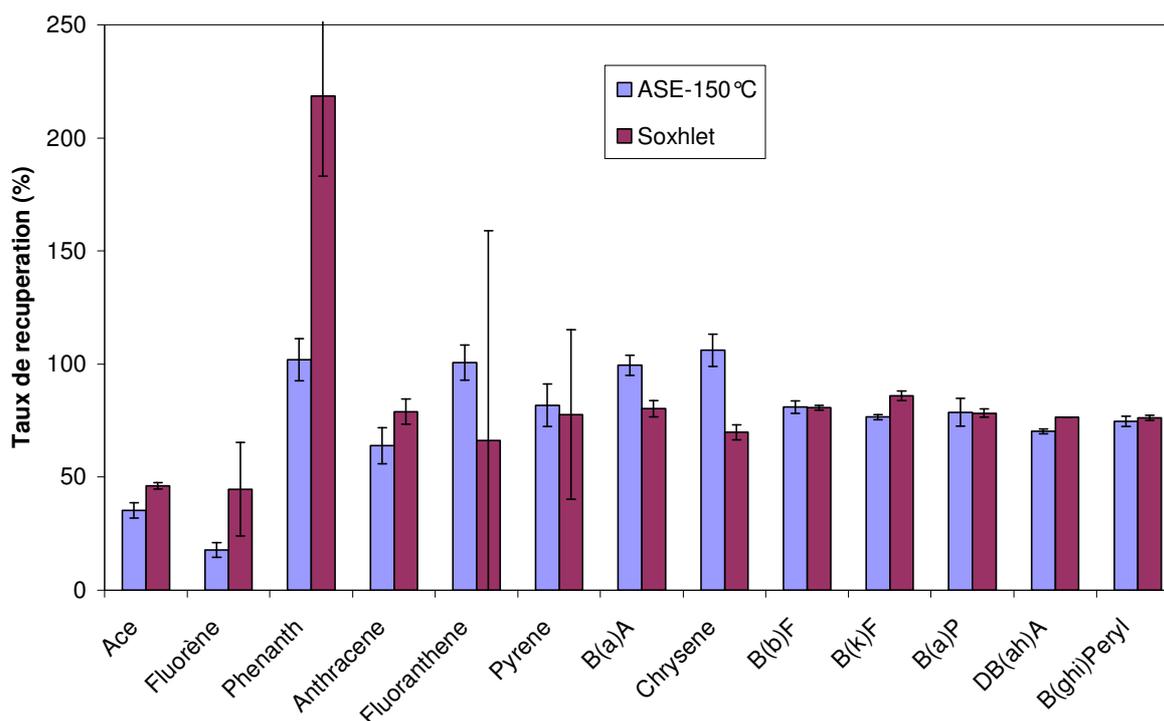


Figure 3.12 : Comparaison des taux de récupération moyens pour chaque HAP à partir de café moulu dopé, obtenus par extraction PSE à 150°C et extraction Soxhlet ($n = 2$, moyennes \pm écarts-types).

En terme de répétabilité, on obtient des choses comparables par les deux techniques, sauf pour certains composés pour lesquels la dispersion est plus importante par la méthode du Soxhlet (i.e. fluorène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène). Cette technique classique permet d'atteindre des taux de recouvrement variant de 66 à 86% pour la plupart des HAP considérés. La récupération de l'acénaphthène et du fluorène est insuffisante (respectivement 46.1 et 44.6%), probablement en raison d'une mauvaise quantification de ces deux composés du fait de la présence de composés interférents. Toutefois l'extraction PSE trouve également ses limites dans les conditions choisies pour la détermination de ces deux composés. Quant au phénanthrène, on observe un taux de recouvrement de l'ordre de 218% (RSD=16.2%), ce qui révèle un problème également dans sa quantification. Deux hypothèses peuvent être formulées : (1) la présence de composés interférents conduisant à une surestimation de l'aire du pic chromatographique, (2) la présence de ce composé dans le café moulu non dopé. L'analyse de café non dopé nous amène à privilégier la seconde hypothèse (i.e. concentration estimée en phénanthrène : $9.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ à comparer aux $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de dopage).

Au vu de ces résultats, l'intérêt de la mise en œuvre de la technique PSE se justifie puisqu'elle est plus rapide et moins consommatrice de solvant, pour l'obtention de taux de récupération

comparables. En outre la PSE permet d'atteindre de meilleurs résultats en termes de justesse et de répétabilité pour certains composés (i.e. fluorène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène), vraisemblablement grâce à une moindre co-extraction de constituants majeurs du café. A titre d'illustration, deux exemples de chromatogrammes sont donnés sur la **Figure 3.13**.

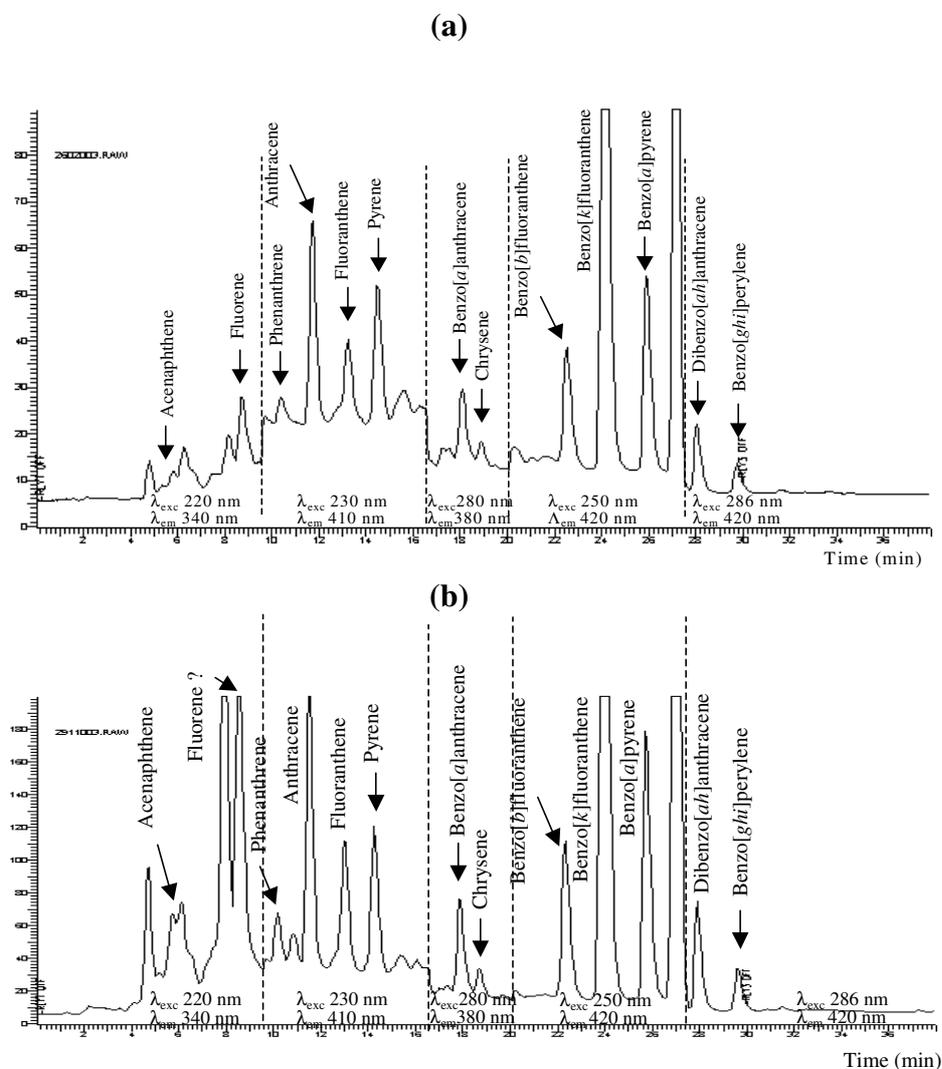


Figure 3.13 : Chromatogrammes d'extraits de café moulu dopé obtenus par extraction PSE ou Soxhlet. (a) PSE (150°C, hexane/acétone 50:50 (v/v)) – Café Colombie (lot 04265) ; (b) Soxhlet – Café Colombie (lot 04037).

3.1.3.2 Comparaison avec une saponification directe

La saponification est souvent appliquée directement sur l'échantillon, sans aucune étape d'extraction préalable. Il nous a donc paru judicieux d'étudier ce mode opératoire, afin de voir si la mise en œuvre d'une extraction PSE en amont se justifie. Les résultats pour chaque HAP, comparés à la réalisation d'une extraction PSE, sont donnés sur la **Figure 3.14** et rassemblés dans le **Tableau 3.6**.

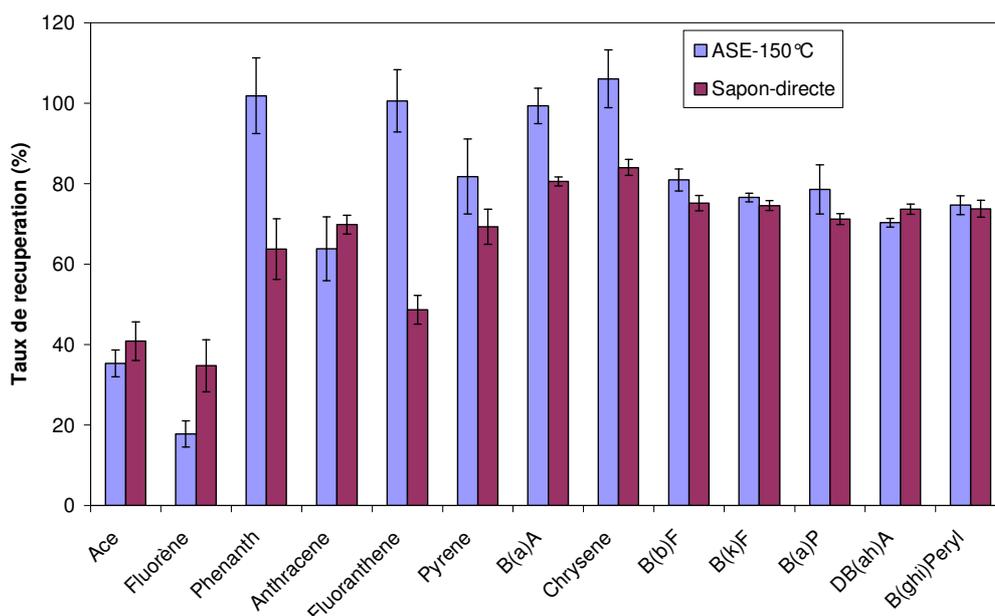


Figure 3.14 : Comparaison des taux de récupération moyens pour chaque HAP à partir de café moulu dopé, obtenus par extraction PSE à 150°C (n = 2) et saponification directe (n = 3) (moyennes ± écarts-types).

La répétabilité est identique dans le cas d'une saponification directe (RSD : 1.4 - 18.6% par comparaison avec 1.4 - 18.4% avec la PSE), en dépit du fait qu'une étape de traitement de l'échantillon ait été supprimée (ce qui aurait pu conduire à une meilleure répétabilité). En revanche les taux de récupération moyens des HAP sont généralement plus bas que ceux atteints avec la PSE, avec des valeurs variant entre 48.7 et 84.1% (fluoranthène et chrysène respectivement). Il n'y a que dans le cas du fluorène que la récupération semble améliorée, mais ces résultats sont à prendre avec précaution en raison de la présence de composés interférents sur le chromatogramme comme l'illustre la **Figure 3.15**.

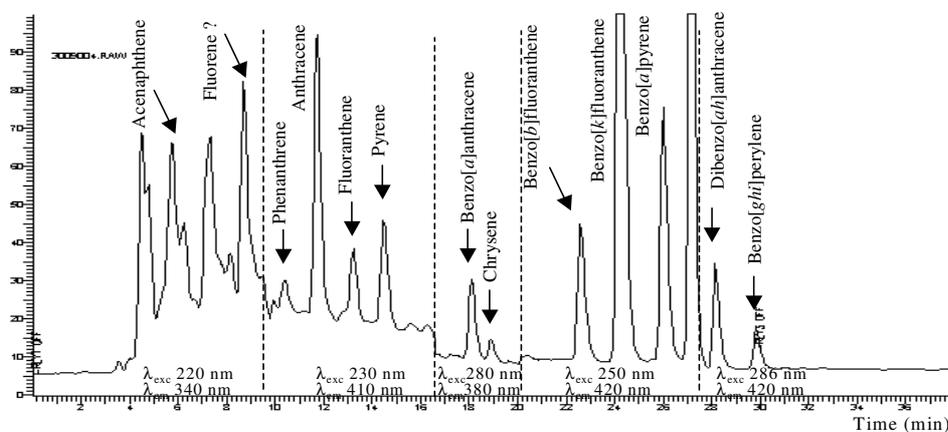


Figure 3.15 : Chromatogramme d'un extrait de café moulu dopé obtenu par saponification directe – Café Colombie (lot 040367).

3.1.3.3 Conclusion

Bien que le coût de l'appareillage PSE soit assez élevé par rapport à celui requis pour mettre en œuvre l'extraction par Soxhlet ou la saponification directe, la mise en œuvre de cette technique récente se justifie. En effet, pour des résultats comparables, elle ne nécessite que 20 min au total contre 6 h pour le Soxhlet. De plus, la PSE permet l'obtention de meilleurs taux de récupération que la saponification directe. Par conséquent nous avons retenu l'extraction PSE pour la suite de notre étude. Comme nous l'avons souligné, la présence de matière grasse dans l'extrait recueilli nécessite une saponification ultérieure, associée à une étape de partage liquide-liquide, suivie ensuite d'une purification sur silice. En dépit de ces multiples étapes successives et souvent manuelles, les taux de récupération des HAP ajoutés aux échantillons de café moulu testés sont très satisfaisants et répétables.

3.1.4 Evaluation des performances de la méthode

Pour évaluer les performances de la méthode, plusieurs paramètres classiques ont été déterminés. Ainsi le domaine de linéarité a été estimé en analysant 11 solutions étalons dans la gamme de concentrations 5 – 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 600 et 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Ceci permet de définir la droite de calibration pour chacun des HAP testés dans ce domaine de linéarité, et le coefficient de régression correspondant (r^2). Les limites de détection (LOD) de la procédure analytique ont été estimées grâce à l'analyse de 10 blancs, en prenant comme critère un rapport signal sur bruit de 3 comme cela est classiquement réalisé (cf **annexe 4**). Ces limites sont appelées « limites analytiques » car elles font référence aux concentrations détectables dans l'extrait final obtenu avant analyse. En tenant compte de la prise d'essai initiale de café moulu (5 g) et du volume d'extrait final (0.4 mL), nous avons calculé les concentrations détectables dans le café moulu. C'est ce que nous appelons « limites de la méthode ». Les valeurs estimées sont indiquées dans le **Tableau 3.7**.

Les limites de détection estimées pour la méthode vont de 0.11 à 0.18 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (les cas du fluorène et de l'acénaphthène n'étant pas pris en compte, du fait de la présence d'interférents). Ces valeurs sont donc tout à fait acceptables ; elles sont de plus très proches de celles reportées par Camargo et Toledo (2002). Toutefois il est important de souligner qu'elles ont été estimées sur des blancs, et donc par conséquent les limites réelles dans des échantillons de café sont plus élevées en raison de composés interférents, particulièrement pour le fluoranthène.

Tableau 3.7 : Performances de la méthode développée pour la détermination des HAP dans le café moulu. * Les résultats pour l'acénaphthène et le fluorène sont donnés à titre indicatif ; ** y : aire du pic chromatographique, x : concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ; ^aCamargo et Toledo (2002)

Composé	Domaine de linéarité ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Droite de calibration**	r^2	LOD analytique ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD méthode ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	LOD littérature ^a ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Ace*	5 - 600	$y = 2678.5x - 765.54$	0.9986	2.54	0.20	---
Fluorene*	5 - 150	$y = 18582x - 9683.7$	0.9992	4.19	0.33	---
Phen	5 - 500	$y = 413.67x + 773.57$	0.9977	1.65	0.13	---
Anthr	5 - 600	$y = 8595.8x + 25633$	0.9983	1.65	0.13	---
F	5 - 800	$y = 1239.7x + 430.43$	0.9983	1.65	0.13	0.23
Pyr	5 - 800	$y = 2455.4x + 3328.2$	0.9976	1.95	0.16	1.03
B[a]A	5 - 100	$y = 2946.2x + 779.28$	0.9973	1.65	0.13	0.12
Chrys	5 - 500	$y = 877.18x - 1345.6$	0.9983	1.35	0.11	0.37
B[b]F	5 - 800	$y = 5777.8x + 9652.2$	0.9993	1.65	0.13	0.07
B[k]F	5 - 150	$y = 38885x + 28956$	0.9976	1.95	0.16	0.08
B[a]P	5 - 600	$y = 9681.6x + 25566$	0.9992	1.80	0.14	0.07
DB[ah]A	5 - 150	$y = 3462.4x - 3769.3$	0.9982	1.95	0.16	0.17
B[ghi]P	5 - 600	$y = 1477.8x + 918.71$	0.9980	2.25	0.18	0.15

3.1.5 Application à la détermination des HAP dans divers cafés moulus

Nous avons appliqué la procédure analytique précédemment mise au point à des cafés moulus achetés dans le commerce en vue d'évaluer la concentration de chaque HAP contenu dans l'échantillon. La quantification des composés a été réalisée par HPLC-FD, tandis que la confirmation de la présence des HAP a été réalisée par HPLC-UV-DAD et GC-MS/MS. Une tentative de quantification par cette dernière technique a également été menée.

3.1.5.1 Détermination quantitative par analyse HPLC-FD

Plusieurs cafés Arabica du commerce ont été analysés avec la procédure analytique retenue. Parmi ces cafés, on distingue 3 sortes : un café d'origine inconnue car il s'agit d'un mélange (mélange L'Or), des cafés d'origine Amérique latine (Brésil, Colombie et Guatemala), et des cafés d'origine Afrique/Asie (Ethiopie-Inde, Chine, Kenya). Aucune information n'est disponible quant aux conditions dans lesquelles ils ont été torréfiés.

Les concentrations estimées par HPLC-FD dans chaque café pour chacun des HAP sont indiquées dans les **Tableaux 3.8 et 3.9**. Nous avons estimé l'équivalent toxique (TEQ) pour la somme des HAP déterminés, en pondérant la concentration individuelle de chaque HAP par son facteur équivalent toxique (TEF) comme explicité en **annexe 7** [Afssa, Saisine n°2000-SA-0005]. Nous avons également distingué les HAP toxiques (i.e. anthracène, fluoranthène,

benzo[*a*]anthracène, chrysène, benzo[*b*]fluoranthène, benzo[*k*]fluoranthène, benzo[*a*]pyrène, dibenzo[*a,h*]-anthracène, benzo[*g,h,i*]pérylène) des autres composés non toxiques, ainsi que les HAP carcinogènes (i.e. benzo[*a*]anthracène, chrysène, benzo[*b*]fluoranthène, benzo[*k*]-fluoranthène, benzo[*a*]pyrène, dibenzo[*a,h*]anthracène, benzo[*g,h,i*]pérylène). Les proportions en HAP toxiques / HAP non toxiques sont illustrées sur la **Figure 3.16**.

Tableau 3.8 : Concentrations moyennes ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) et écarts-types relatifs (RSD) estimés pour les HAP dans différents cafés moulus : mélange L'Or et cafés originaires d'Amérique latine ($n = 3$ sauf pour Colombie lot 04265 : $n = 4$). Les valeurs inférieures aux limites de détection estimées sont soulignées.

* Les résultats pour l'acénaphène et le fluorène sont donnés à titre indicatif. ** pour ce café, 2 paquets du même lot ont été analysés.

	Mélange L'OR		Brésil		Colombie** lot 04265 21/09/2006		Colombie** lot 04265 21/09/2006		Guatémala	
	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)
Ace*	11.92	5.00	8.06	11.55	11.78	1.38	13.00	93.57	5.62	1.45
Fluorene*	<i>nd</i>	-----	<i>nd</i>	-----	<i>nd</i>	-----	0.09	91.83	<i>nd</i>	-----
Phen	7.08	6.71	6.27	4.69	8.90	4.59	20.24	25.80	6.34	4.97
Anthr	0.96	14.40	0.41	10.13	1.79	9.76	3.52	38.36	0.42	3.97
F	11.18	13.31	3.17	3.69	16.04	8.13	21.45	12.45	4.61	16.01
Pyr	4.15	11.87	1.52	8.66	9.68	10.09	12.31	27.49	3.34	19.14
B[<i>a</i>]A	0.63	11.01	0.19	21.39	0.97	13.26	0.91	15.75	0.51	22.80
Chrys	2.00	30.60	0.98	6.31	2.54	9.19	1.98	35.44	1.42	20.60
B[<i>b</i>]F	<i>nd</i>	-----	traces	-----	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.48	28.05	<i>nd</i>	<i>nd</i>
B[<i>k</i>]F	traces	-----	traces	-----	traces	-----	0.21	23.31	traces	-----
B[<i>a</i>]P	<i>nd</i>	-----	traces	-----	traces	-----	0.31	29.09	traces	-----
DB[<i>ah</i>]A	<i>nd</i>	-----	<i>nd</i>	-----	<i>nd</i>	-----	<i>nd</i>	-----	<i>nd</i>	-----
B[<i>ghi</i>]P	<i>nd</i>	-----	<i>nd</i>	-----	<i>nd</i>	-----	<i>nd</i>	-----	<i>nd</i>	-----
Σ 13HAP	37.93		20.65		51.97		74.50		22.30	
Σ 11HAP	25.99		12.60		40.20		61.41		16.68	
Σ HAP toxiq	14.77		4.81		21.62		28.86		7.00	
Σ HAP carcin	2.64		1.22		3.79		3.89		1.97	
TEQ (13HAP)	0.22		0.09		0.45		0.75		0.15	
TEQ (11HAP)	0.21		0.09		0.44		0.74		0.15	

Tableau 3.9 : Concentrations moyennes ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) et écarts-types relatifs (RSD) estimés pour les HAP dans différents cafés moulus : cafés originaires d'Afrique et d'Asie ($n = 3$).

* Les résultats pour l'acénaphthène et le fluorène sont donnés à titre indicatif.

	Kénya		Ethiopie-Inde		Chine	
	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)
Ace*	5.00	2.26	4.10	12.61	nd	-----
Fluorene*	3.39	5.64	0.02	60.80	nd	-----
Phen	2.68	3.74	8.26	16.92	11.55	12.64
Anthr	0.62	5.14	0.91	11.69	0.53	4.42
F	7.14	1.36	12.23	8.56	12.84	12.08
Pyr	3.63	0.16	5.28	1.24	4.91	4.13
B[a]A	0.14	22.59	0.47	36.01	4.06	0.84
Chrys	1.36	16.39	3.25	11.24	18.25	1.11
B[b]F	0.036	45.93	nd	-----	3.83	6.13
B[k]F	0.26	0.32	traces	-----	0.12	28.15
B[a]P	traces	-----	nd	-----	nd	-----
DB[ah]A	nd	-----	nd	-----	nd	-----
B[ghi]P	nd	-----	nd	-----	nd	-----
Σ 13HAP	24.26		34.53		56.09	
Σ 11HAP	15.89		30.42		56.09	
Σ HAP toxiq	9.58		16.87		39.63	
Σ HAP carcin	1.82		3.74		26.26	
TEQ (13HAP)	0.16		0.22		1.12	
TEQ (11HAP)	0.15		0.22		1.12	

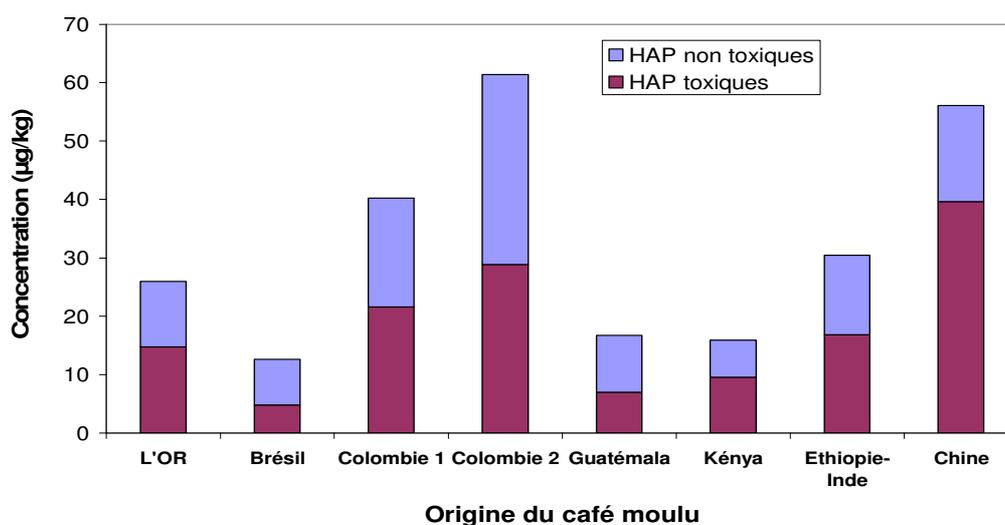


Figure 3.16 : Evaluation des concentrations en HAP toxiques et non toxiques pour 11 HAP analysés dans divers cafés moulus ($n = 3$) (moyennes \pm écarts-types).

Les concentrations individuelles des HAP varient de non détecté à $21.45 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Le fluoranthène est globalement majoritaire quel que soit le café ($3.17\text{-}21.45 \mu\text{g.kg}^{-1}$), avec comme autres HAP abondants le phénanthrène ($2.68\text{-}20.24 \mu\text{g.kg}^{-1}$) et le pyrène ($1.52\text{-}12.31 \mu\text{g.kg}^{-1}$). La somme des 11 HAP varie de $12.60 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Brésil) à $61.41 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Colombie). Pour les HAP carcinogènes, cette concentration varie de $1.22 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Brésil) à $26.26 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Chine). Parmi les HAP carcinogènes mis en évidence dans cette étude, le chrysène est le plus concentré avec des valeurs comprises entre $0.98 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Brésil) et $18.25 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Chine). La concentration du benzo[*a*]anthracène varie entre $0.14 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Kénya) et $4.06 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Chine). Le benzo[*a*]pyrène est lui retrouvé à l'état de traces avec des valeurs proches de la limite de détection, sauf dans un lot du café Colombie ($0.31 \mu\text{g.kg}^{-1}$), ce qui est cohérent avec les valeurs reportées dans la littérature (cf. chapitre 1). Enfin le dibenzo[*a,h*]anthracène et le benzo[*g,h,i*]pérylène restent indétectables quelle que soit l'origine du café.

L'équivalent toxique des 11 HAP varie entre $0.09 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Brésil) et $1.12 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Chine). Globalement les fractions HAP toxiques / non toxiques sont équivalentes, sauf pour les cafés du Kénya, d'Ethiopie-Inde et de Chine ; il serait intéressant de poursuivre l'étude pour savoir si l'origine Afrique/Asie de ces cafés peut expliquer cette observation.

3.1.5.2 Confirmation de la présence des HAP par HPLC-UV-DAD

L'analyse des extraits de cafés moulus a été réalisée dans un premier temps par HPLC-UV-DAD afin de confirmer la présence suspectée des différents HAP. Un exemple de chromatogramme est donné sur la **Figure 3.17**.

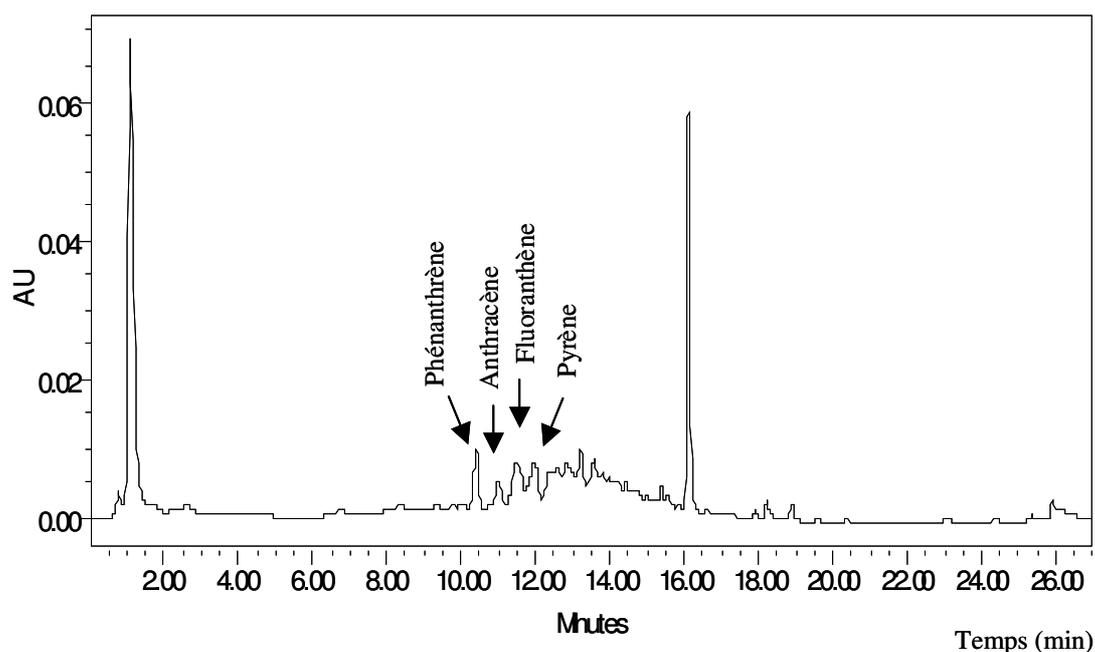


Figure 3.17 : Chromatogramme obtenu par HPLC-UV-DAD (à 254 nm) pour un échantillon de café Colombie non dopé (lot 04265, 21/09/2006).

Seuls les 4 HAP indiqués sur la figure ont pu être identifiés par comparaison des spectres UV obtenus dans l'extrait de café avec les spectres des mêmes composés dans des solutions étalons (préparées dans le même solvant que les extraits, c'est-à-dire le THF), comme illustré par la **Figure 3.18**.

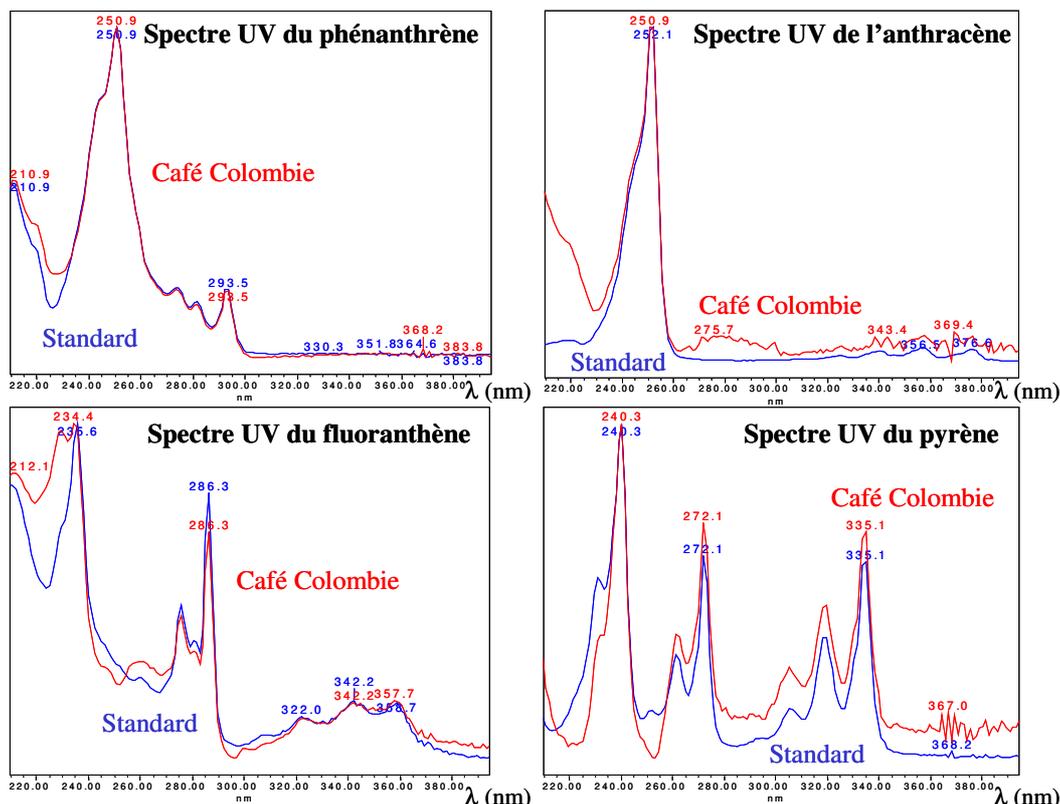


Figure 3.18 : Comparaison des spectres UV obtenus pour une solution standard et un échantillon de café Colombie non dopé.

Par conséquent des analyses ont également été réalisées par GC-MS/MS afin de confirmer la présence d'autres HAP.

3.1.5.3 Confirmation de la présence des HAP par GC-MS/MS

Les extraits de café ont été analysés par GC-MS/MS afin d'identifier les composés suspectés dans les échantillons. Cette identification a été faite grâce aux différents spectres obtenus par l'analyse de solutions standards préparées dans le même solvant que les extraits. Un exemple de chromatogramme est donné sur la **Figure 3.19**.

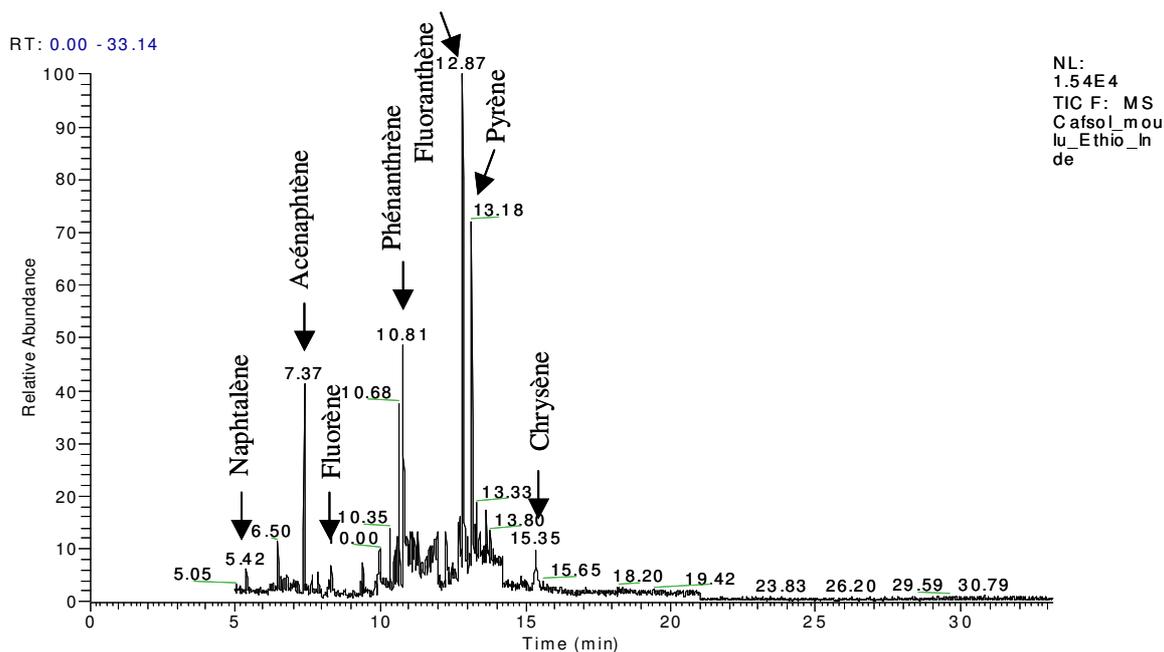


Figure 3.19 : Chromatogramme obtenu par GC-MS/MS pour un échantillon de café Ethiopie-Inde non dopé.

La comparaison des spectres de masse obtenus à partir des ions fils sélectionnés nous a permis d'identifier plusieurs HAP tels que le naphtalène, l'acénaphylène, l'acénaphène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo[*a*]anthracène et le chrysène. A titre d'exemple, les spectres de masse de deux HAP toxiques, le fluoranthène et le benzo[*a*]anthracène, sont donnés sur la **Figure 3.20**. La totalité des spectres est présentée dans l'**annexe 8**.

Pour certains HAP la comparaison des spectres ne nous a pas permis de confirmer avec certitude la présence des HAP, malgré la présence de certains massifs caractéristiques. C'est le cas par exemple du benzo[*a*]pyrène comme l'illustre la **Figure 3.21**. Il est probable que ceci soit lié au manque de sensibilité de l'appareillage vu les faibles concentrations des composés recherchés.

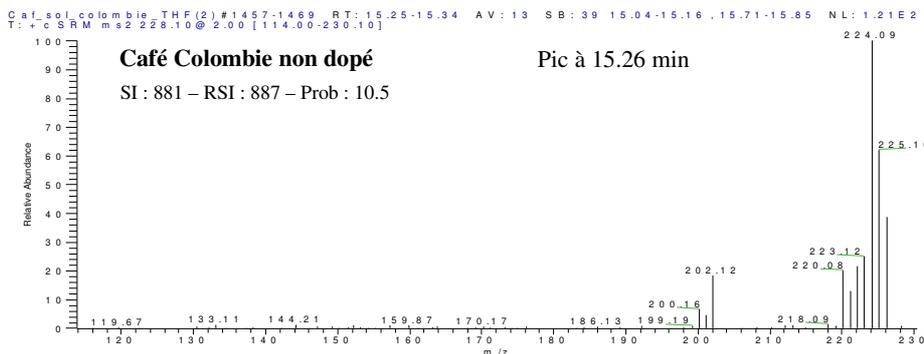
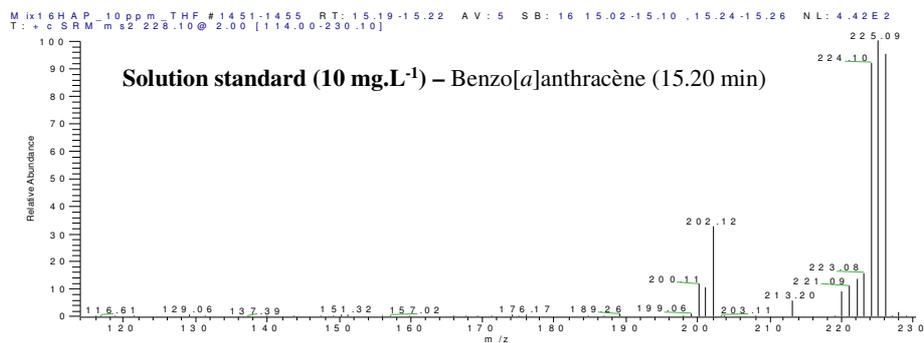
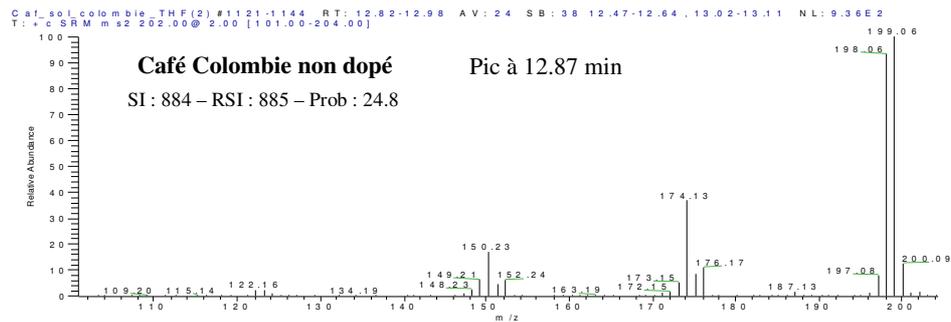
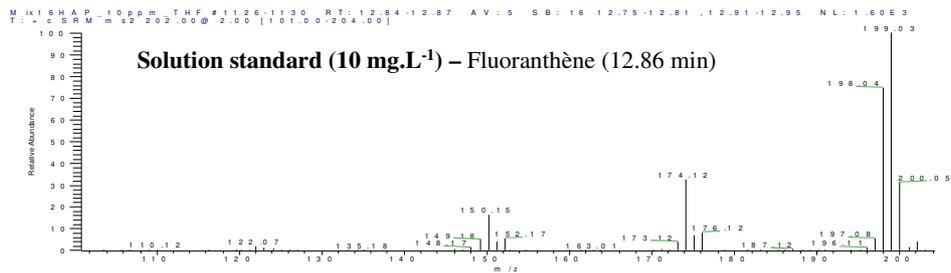


Figure 3.20 : Comparaison des spectres de masse MS² obtenus pour le fluoranthène et le benzo[a]anthracène dans une solution standard et un échantillon de café Colombie.

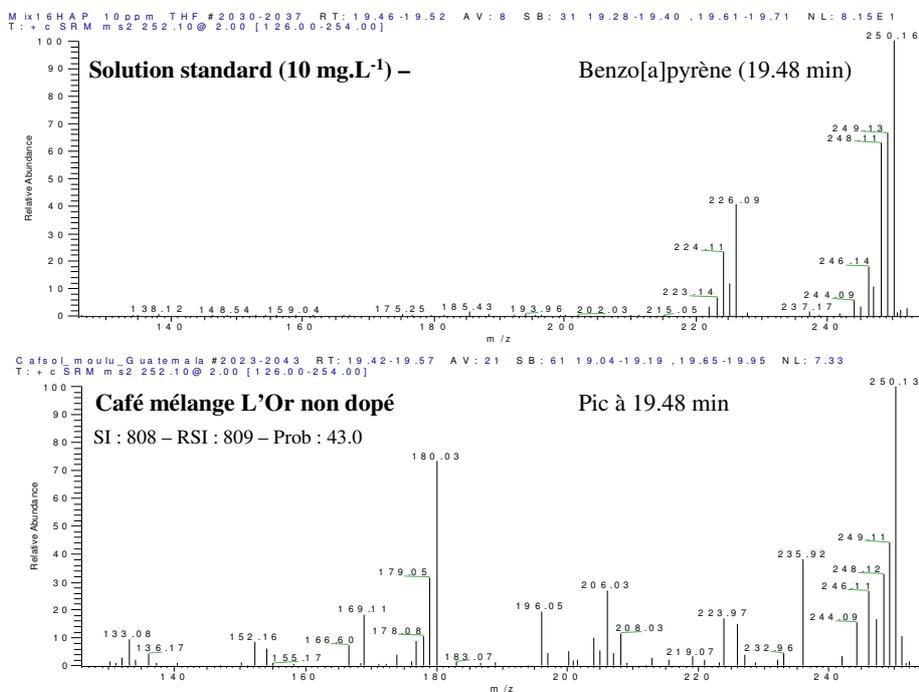


Figure 3.21 : Comparaison des spectres de masse MS^2 obtenus pour le benzo[a]pyrène dans une solution standard et un échantillon de café Mélange L'Or.

3.1.5.4 Détermination quantitative par GC-MS/MS

Si les HAP ont pu être pour la plupart confirmés par GC-MS/MS, cela ne nous donne aucune indication sur la surestimation possible de leurs concentrations lors de l'analyse par HPLC-FD. Par conséquent, nous avons tenté de confirmer ces concentrations en réalisant une analyse quantitative par GC-MS/MS. Pour cela nous avons utilisé un étalonnage externe ; par conséquent il s'agit d'une quantification grossière, puisque des variations en quantités injectées dans la colonne sont possibles lors de la vaporisation de l'échantillon dans l'injecteur. Un exemple de chromatogramme est présenté sur la **Figure 3.22**. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 3.10**, et comparés aux concentrations précédemment estimées par HPLC-FD.

Les deux premiers composés, à savoir le naphthalène et l'acénaphthylène, n'ont pas été identifiés en HPLC-FLD parce que non détectés (longueurs d'onde non adaptées dans le cas du premier, pas de fluorescence du second composé).

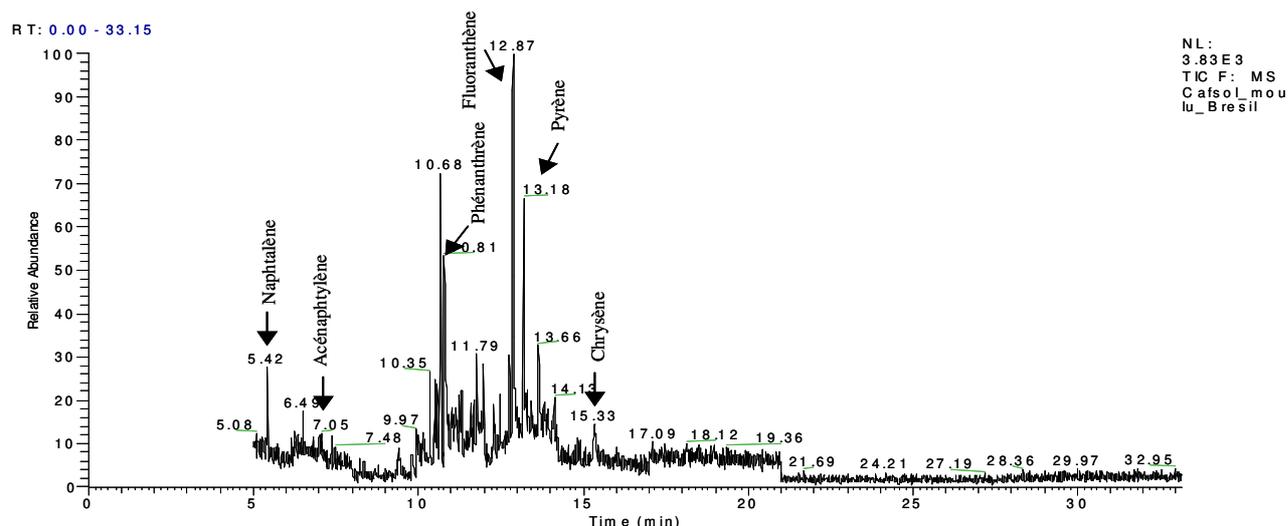


Figure 3.22 : Chromatogramme d'un extrait de café moulu non dopé d'origine Brésil (analyse par GC-MS/MS).

Tableau 3.10 : Concentrations moyennes ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) estimées pour les HAP dans différents cafés moulus, soit par GC-MS/MS, soit par HPLC-FD. * afin de comparer avec l'analyse par HPLC-FD nous n'avons pas pris en compte le naphthalène et l'acénaphthylène pour la somme des HAP.

	Café origine Ethiopie-Inde		Café origine Brésil		Café origine Colombie		Café mélange L'Or		Café origine Guatemala	
	HPLC-FD Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	GC-MS/MS Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)								
Naphthalène	nd	0.77	nd	1.34	nd	1.16	nd	1.28	nd	0.62
Acénaphthylène	nd	nd	nd	0.17	nd	nd	nd	0.13	nd	nd
Acénaphthène	4.10	9.71	8.06	0.09	11.78	9.05	11.92	3.49	5.62	0.17
Fluorène	0.02	1.40	nd	0.05	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Phénanthrène	8.26	13.68	6.27	3.32	8.90	12.60	7.08	8.79	6.34	3.12
Anthracène	0.91	2.19	0.41	0.79	1.79	2.84	0.96	1.53	0.42	1.07
Fluoranthène	12.23	12.52	3.17	4.82	16.04	16.94	11.18	7.58	4.61	5.69
Pyrène	5.28	6.66	1.52	1.78	9.68	10.46	4.15	4.27	3.34	3.95
B[a]A	0.47	0.57	0.19	0.23	0.97	0.92	0.63	0.48	0.51	0.35
Chrysène	3.25	1.49	0.98	0.87	2.54	3.77	2.00	2.80	1.42	1.53
B[b]F	nd	nd	0.02	0.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B[k]F	0.01	nd	0.01	nd	0.15	0.91	0.01	nd	0.01	nd
B[a]P	nd	nd	0.02	nd	0.12	0.64	nd	nd	0.03	0.39
DB[ah]A	nd	nd								
B[ghi]P	nd	nd								
$\Sigma 13\text{HAP}^*$	34.53	48.22	20.65	12.15	51.97	58.13	37.93	28.94	22.30	16.27
$\Sigma 11\text{HAP}$	30.42	37.11	12.60	12.01	40.20	49.08	25.99	25.45	16.68	16.10
$\Sigma \text{HAP toxiq}$	16.87	16.77	4.81	6.91	21.62	26.02	14.77	12.39	7.00	9.03
$\Sigma \text{HAP carcin}$	3.74	2.06	1.22	1.30	3.79	6.24	2.64	3.28	1.97	2.27
TEQ (13HAP)	0.22	0.23	0.09	0.11	0.45	1.07	0.22	0.17	0.15	0.51
TEQ (11HAP)	0.22	0.22	0.09	0.11	0.44	1.06	0.21	0.17	0.15	0.51

Globalement les résultats sont comparables avec les deux méthodes quel que soit le café, ce qui confirme la pureté des pics obtenus en HPLC-FD, sauf pour l'acénaphène pour lequel on a une surestimation quasi-systématique par HPLC-FD ; ceci n'est pas surprenant puisque nous avons déjà mentionné la difficulté de quantifier ce composé par cette méthode en raison de composés interférents. Il semble toutefois que l'équivalent toxique soit sous-estimé par HPLC-FD pour les cafés Colombie et Guatemala en raison d'un manque de sensibilité pour le benzo[*k*]fluoranthène et le benzo[*a*]pyrène.

3.2 Détermination des HAP dans le café boisson

Nous avons choisi de mettre au point une méthode de détermination des HAP dans le café boisson basée sur l'extraction en phase solide. Dans un premier temps, l'optimisation des conditions d'extraction a été réalisée en étudiant trois HAP « modèles », le fluoranthène, le benzo[*b*]fluoranthène et le benzo[*a*]pyrène, dans un souci de simplicité. L'application aux 16 HAP a ensuite été réalisée afin de valider la procédure analytique développée. Enfin, la mise en œuvre d'une étape de saponification a été étudiée.

3.2.1 Optimisation des conditions d'extraction en phase solide

Le choix des conditions de SPE a porté sur la nature du support solide, la masse de support (0.2 ou 0.5 g), la nature du solvant d'élution (MeOH, MeOH/THF 50/50, MeOH/THF 20/80, MeOH/THF 10/90), ainsi que le volume d'élution (fractions successives de 2 mL). De par la nature aqueuse du café boisson, nous avons choisi des supports hydrophobes pour maximiser la rétention des HAP : la silice greffée octadécyle (C18) et le copolymère styrène-divinylbenzène (PS-DVB). Durant cette phase d'optimisation des conditions opératoires, les échantillons de café boisson étudiés ont tous été dopés (i.e. ajout de 100 ng de chacun des 3 HAP « modèles »), et nous avons recherché les conditions expérimentales pouvant conduire à des taux de récupération supérieurs à 90%.

Afin d'estimer les pertes possibles en HAP au cours de cette étape de SPE, nous avons recueilli plusieurs fractions possibles en vue de leur analyse comme indiqué sur la **Figure 3.23**. Ainsi l'échantillon de café boisson, après avoir percolé sur une première cartouche de SPE (SPE 1), a été récupéré puis percolé sur une seconde cartouche (SPE 2), identique à la première, afin de récupérer les HAP n'ayant pas été retenus par la première cartouche. Du méthanol (7 mL) a été rajouté au café boisson pour limiter l'adsorption des HAP sur les parois du bécher. Malgré cela, le bécher ayant contenu le café boisson dopé a été rincé avec du méthanol (8 mL) afin de solubiliser d'éventuels HAP adsorbés sur les parois du récipient ; cette fraction a ensuite été concentrée (jusqu'à environ 2 mL) avant d'être analysée par

HPLC-FD. Le taux de recouvrement total est alors estimé en tenant compte de la quantité en HAP qui a effectivement traversé la cartouche de SPE, comme détaillé sur la **Figure 3.23**. Parallèlement certains blancs ont été réalisés afin d'expliquer certaines pertes en HAP observées au cours de cette procédure, comme nous le détaillerons ultérieurement.

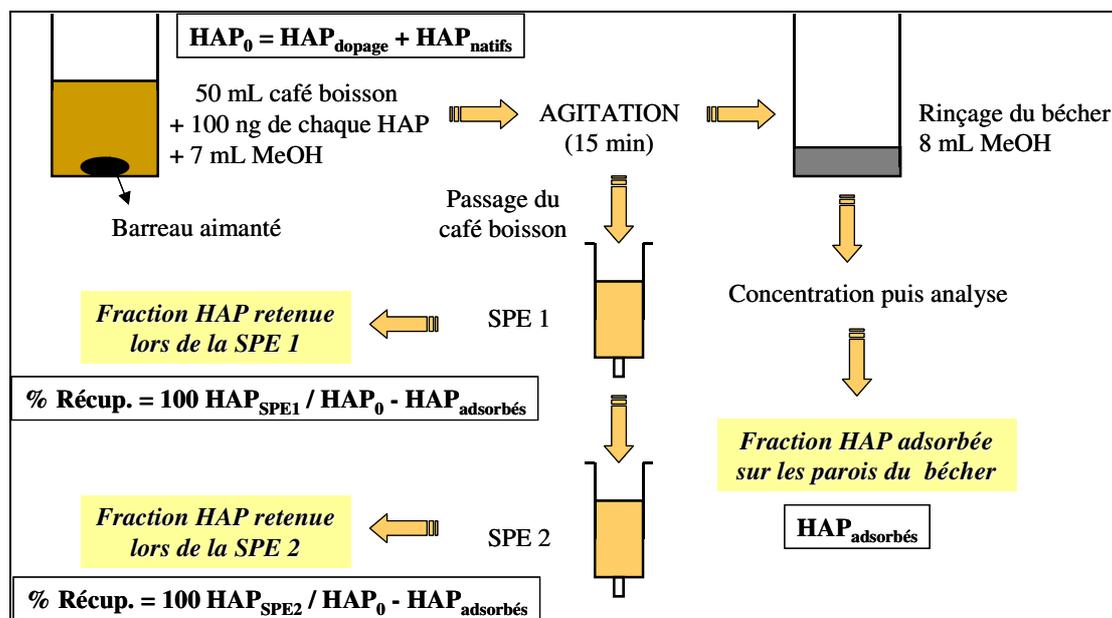


Figure 3.23 : Bilan des différentes fractions recueillies afin d'estimer les pourcentages de récupération des HAP (% Récup.) lors des étapes de SPE, ainsi que la fraction en HAP adsorbée sur les parois du bécher ayant contenu le café boisson.

3.2.1.1 SPE sur copolymère styrène-divinylbenzène

Nous avons utilisé le copolymère PS-DVB en raison de son caractère hydrophobe et des interactions de type transfert de charge (ou interaction π - π) produites entre les HAP et cet adsorbant. Nous avons tout d'abord mené nos expériences avec une masse de copolymère PS-DVB de 0.2 g afin de minimiser le volume de solvant d'élution des analytes, et partant la dilution de l'extrait obtenu.

3.2.1.1.1 Choix du solvant d'élution

Pour étudier l'effet du solvant d'élution, des mélanges de solvants méthanol/tétrahydrofurane (50/50, 20/80, 10/90 v/v) ont été testés sur le PS-DVB 0.2 g afin d'éluer les HAP retenus (cf chapitre 2 : expériences SPE-DVB 1, 1bis, 2 et 3). Les concentrations estimées en HAP pour les différentes fractions recueillies sont données dans le **Tableau 3.11**.

Tableau 3.11 : Rendements moyens de récupération obtenus pour les 3 HAP étudiés après SPE sur PS-DVB 0.2 g, avec différents mélanges MeOH/THF comme solvants d'éluion.

Conditions expérimentales : Dopage café boisson ou eau (30 ou 50 mL); éluion avec MeOH-THF 50/50, 20/80 ou 10/90 (v/v) (fractions de 2 mL). np : expérience non réalisée ; nd : non détecté.

	Elution MeOH-THF 50/50		Elution MeOH-THF 20/80		Elution MeOH-THF 20/80		Elution MeOH-THF 10/90		Elution MeOH-THF 10/90	
	Expérience SPE-DVB 1bis		Expérience SPE-DVB 2		Expérience SPE-DVB 2		Expérience SPE-DVB 3		Expérience SPE-DVB 3	
	Café boisson 50 mL Café mélange L'Or Lot P5 07:37		Café boisson 50 mL Café mélange L'Or Lot P5		Eau 50 mL		Café boisson 50 mL Café mélange L'Or Lot P5 12:26		Café boisson 30 mL Café mélange L'Or Lot P6 18:26	
	Moyenne (%)	RSD (%)	Moyenne (%)	RSD (%)	Moyenne (%)	RSD (%)	Moyenne (%)	RSD (%)	Moyenne (%)	RSD (%)
Adsorption sur les parois du bécher										
F	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B[b]F	2.8	91.3	4.6	14.8	16.1	8.8	8.0	12.7	1.3	19.2
B[a]P	5.1	19.8	4.9	7.0	16.2	6.3	7.4	12.1	1.1	17.2
SPE 1										
Fraction 1										
F	67.8	3.1	75.6	4.3	74.9	5.9	85.9	6.9	107.7	7.8
B[b]F	61.2	3.0	71.0	0.6	76.9	2.4	81.4	7.6	71.8	4.9
B[a]P	55.6	6.2	59.3	13.7	74.0	0.7	84.4	2.8	74.7	2.6
Fraction 2										
F	4.8	106.3	nd	nd	11.8	23.9	nd	nd	nd	nd
B[b]F	8.1	22.6	4.0	28.1	11.7	14.0	2.3	9.4	4.8	23.9
B[a]P	11.9	18.7	5.8	8.6	13.8	15.6	5.0	12.5	5.3	25.0
Total SPE 1										
F	72.6	9.5	75.6	4.3	86.7	1.8	85.9	6.9	107.7	7.8
B[b]F	69.7	1.3	74.9	1.7	88.6	1.4	83.7	7.1	76.6	4.6
B[a]P	67.5	6.3	65.1	11.8	87.8	2.0	89.4	2.1	80.0	2.1
SPE 2										
Fraction 1										
F	nd	nd	nd	nd	np	np	nd	nd	nd	nd
B[b]F	13.8	8.6	12.7	9.2	np	np	12.7	2.7	20.8	2.8
B[a]P	10.0	32.3	9.9	12.3	np	np	14.3	8.0	20.6	5.9
Fraction 2										
F	nd	nd	np	np	np	np	np	np	np	np
B[b]F	4.1	0.6	np	np	np	np	np	np	np	np
B[a]P	5.9	7.5	np	np	np	np	np	np	np	np
SPE 1 + SPE 2										
F	72.6	9.5	75.6	4.3	86.7	1.5	85.9	6.9	107.7	7.8
B[b]F	87.6	1.5	87.7	0.7	88.6	1.2	96.4	6.3	97.4	3.9
B[a]P	83.4	7.9	75.0	11.2	87.8	1.6	103.7	1.4	100.7	1.7

Plusieurs observations peuvent être réalisées au vu de ces résultats. Tout d'abord, on peut noter que l'adsorption des HAP sur les parois du bécher ayant contenu le café boisson dopé

reste limitée (inférieure à 8% pour chacun des HAP), ce qui indique l'efficacité de l'ajout de méthanol pour limiter ces phénomènes. Il convient néanmoins d'évaluer cette fraction adsorbée, afin de ne pas surestimer la quantité des HAP percolant au travers de la cartouche de SPE.

En ce qui concerne la première SPE, on constate que les rendements de récupération sont meilleurs avec le mélange MeOH/THF 10/90 comme solvant d'élution. En effet, ce solvant d'élution assure des recouvrements moyens variant de 83.7 à 89.4%, alors que les taux de récupération observés sont inférieurs avec les deux autres mélanges étudiés : de 65.1 à 75.6% pour MeOH/THF 20/80, et de 67.5 à 72.6% pour MeOH/THF 50/50. Ces résultats sont en accord avec, d'une part une augmentation de la force éluante du mélange MeOH/THF sur PS-DVB lorsque la teneur en THF augmente, et d'autre part une diminution de la polarité du mélange au fur et à mesure qu'on ajoute du THF lequel favorise la solubilisation des HAP (valeurs de polarité P' : 6.6 pour MeOH et 4.2 pour THF).

Il est important de souligner qu'une fraction relativement importante (10 à 20% environ pour le benzo[*b*]fluoranthène et le benzo[*a*]pyrène) des composés passe au travers de la première cartouche de PS-DVB 0.2 g sans être retenue. La réalisation d'une seconde SPE en série permet en effet de les récupérer, principalement dans la première fraction d'élution (de 9.9 à 14.3% selon les différents solvants utilisés pour l'élution).

Les résultats obtenus en terme de récupération après les deux SPE successives (SPE 1 + SPE 2), en tenant compte des composés adsorbés sur les parois du bécher, sont illustrés sur la **Figure 3.24**.

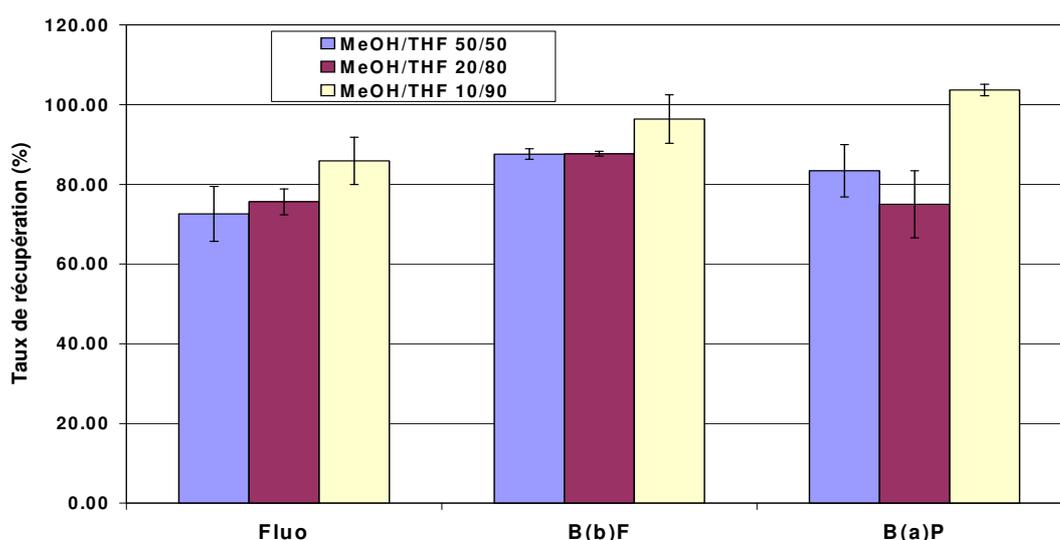


Figure 3.24 : Influence de la nature du solvant d'élution sur les taux de récupération des HAP après deux extractions SPE successives du café boisson sur PS-DVB 0.2 g ($n = 3$; taux de récupération moyens \pm écart-type).

Les meilleurs résultats sont obtenus avec le mélange MeOH/THF 10/90. En effet ce mélange permet d'éluer la totalité du benzo[*a*]pyrène au cours des deux SPE successives, 96.4% du benzo[*b*]fluoranthène et 85.9% du fluoranthène. Par conséquent, c'est le mélange MeOH/THF 10/90 qui a été retenu pour la suite de l'étude.

Malgré tout nous constatons que, dans les conditions testées, la récupération du fluoranthène et du benzo[*b*]fluoranthène est insuffisante. Par suite, la masse d'adsorbant se révèle trop faible dans ce cas. Deux explications peuvent être avancées : (1) une saturation du support solide par des composés majeurs du café ce qui limite la rétention des composés d'intérêt, (2) une mauvaise rétention des HAP sur le support liée à leur complexation avec certains composés du café (ex : la caféine) et leur entraînement lors de la percolation du café. Deux expériences complémentaires ont donc été réalisées afin de comprendre les phénomènes impliqués dans cette rétention incomplète des HAP.

3.2.1.1.2 Mise en évidence d'effets de matrice

Lors de la préparation du café boisson à partir du café moulu et de l'eau, de nombreux composés en dehors de ceux que nous recherchons, sont passés dans la phase liquide (boisson). Ces composés sont généralement co-extraits avec les analytes d'intérêt lors de l'extraction en phase solide. Ainsi, l'étude de l'effet de ces composés interférents s'avère nécessaire pour justifier probablement le taux de récupération trop faible ou aléatoire de certains composés d'intérêt. En effet, l'extraction réalisée sur la cartouche PS-DVB 0.2 g a permis de déceler une légère perte des HAP, probablement due à la saturation de l'adsorbant par des composés non désirés contenus dans l'échantillon de café.

Dans un premier temps nous avons fait une expérience complémentaire en partant d'un volume plus limité de café boisson (i.e. 30 mL au lieu de 50 mL), afin de limiter la quantité de composés interférents. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3.11**. Si le fluoranthène est alors quantitativement récupéré, les résultats ne sont pas probants pour les deux autres HAP, puisque 20% environ passent au travers de la première cartouche et sont récupérés lors de la seconde SPE. Par conséquent, il n'est pas envisageable de limiter le volume de café boisson à analyser, et ce d'autant que cela conduit parallèlement à une réduction des limites de détection de la méthode en diminuant les facteurs d'enrichissement de celle-ci.

Dans un second temps, nous avons fait percoler de l'eau dopée, afin de s'affranchir complètement des composés interférents contenus dans le café boisson. Ainsi, le comportement des HAP au cours de la SPE peut être appréhendé. Les résultats sont également donnés dans le **Tableau 3.11** afin de les comparer aux résultats précédents. On constate que,

suite à la première SPE, les taux de recouvrement des trois HAP (variant de 86.7 à 88.6%) sont sensiblement supérieurs à ceux obtenus avec le café boisson dopé (variant de 65.1 à 75.6%), pour le même solvant d'éluion MeOH/THF 20/80. Ces résultats sont représentés graphiquement sur la **Figure 3.25**.

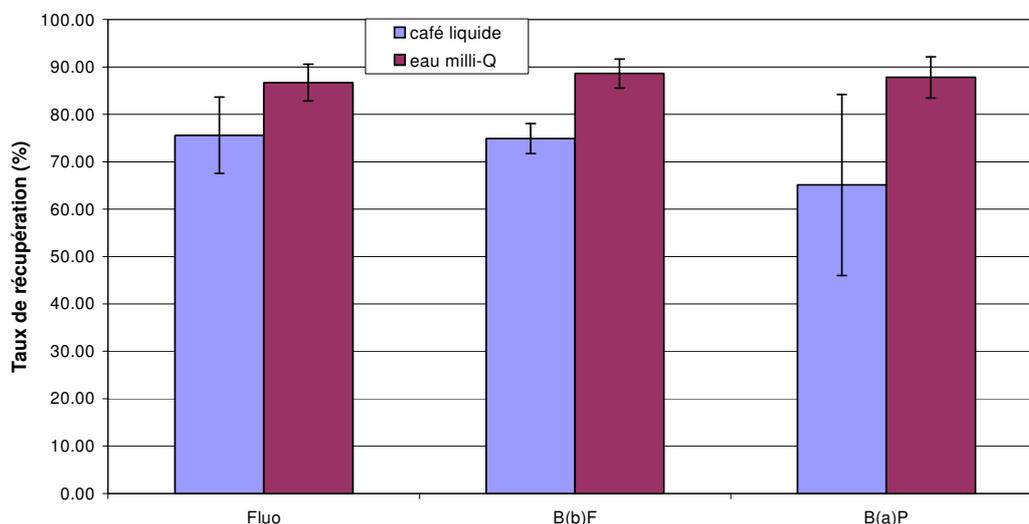


Figure 3.25 : Rendements de récupération (%) des 3 HAP contenus dans le café boisson et l'eau milli-Q dopés après l'étape de SPE 1 (n = 3, taux de récupération moyens ± intervalles de confiance à 95%).

En outre, aucun composé d'intérêt n'est détecté dans les fractions d'éluion de la seconde SPE. Cela semble confirmer l'hypothèse selon laquelle les HAP seraient complètement retenus sur la première cartouche, et insuffisamment élués ensuite en raison d'une force éluante trop faible pour le mélange MeOH/THF 20/80 (v/v) comme déjà observé précédemment. Ces résultats illustrent bien l'effet de la matrice « café boisson » dans les expériences précédentes, et la nécessité de développer la méthode sur des échantillons réels dopés pour tenir compte des composés interférents.

Il convient de noter également que les phénomènes d'adsorption des HAP sur les parois du bécher initial sont plus importants dans le cas de l'eau dopée que pour le café boisson (environ 16% pour le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène, les deux composés les plus hydrophobes). Là encore l'effet des constituants de la matrice est évident. En effet, dans le café boisson sont présents des composés susceptibles de complexer les HAP (telle la caféine), et donc d'augmenter leur solubilité par comparaison avec l'eau, et de fait de diminuer leur adsorption sur les parois du récipient [Hischenhuber et Stijve (1987) ; Moret et al. (2000) ; Camargo et Toledo (2002)].

En conclusion, en raison des constituants majeurs du café boisson, il convient de choisir une masse de PS-DVB plus importante afin de retenir quantitativement les HAP durant la première étape de SPE.

3.2.1.1.3 Choix de la masse d'adsorbant

Pour éviter la perte de rendement sur les gros volumes en faisant deux SPE de suite, réduire le volume de notre échantillon ou éviter la saturation des sites actifs, il faut donc augmenter la masse d'adsorbant. Nous avons donc tout d'abord utilisé des cartouches remplies de PS-DVB avec une masse d'adsorbant de 0.5 g (cf chapitre 2 : expérience SPE-DVB 4). L'élution a été réalisée avec des fractions successives de 2 mL, afin d'appréhender le volume d'élution nécessaire et minimiser celui-ci. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3.12**.

Tableau 3.12 : Rendements moyens de récupération obtenus pour les 3 HAP étudiés après SPE sur cartouche remplie avec 0.5 g d'adsorbant.

*Conditions expérimentales : Dopage café boisson et eau (50 mL) ; élution avec MeOH-THF 10/90 (v/v) (fractions de 2 mL). np : expérience non réalisée ; nd : non détecté. * Pour ce café, le café boisson non dopé n'a pas été analysé.*

	PS-DVB 0.5 g Expérience SPE-DVB 4 Café boisson 50 mL Café mélange L'Or Lot P6 18-09-04*		PS-DVB 0.5 g Expérience SPE-DVB 4 Eau 50 mL		Silice C18 0.5 g Expérience SPE-C18 3 Café boisson 50 mL Café mélange L'Or Lot P5 31-12-03	
	Moyenne (%)	RSD (%)	Moyenne (%)	RSD (%)	Moyenne (%)	RSD (%)
Adsorption sur les parois du bécher						
F	nd	nd	8.8	4.7	nd	nd
B[b]F	3.1	1.9	22.8	3.7	3.6	12.5
B[a]P	2.6	9.6	20.7	13.7	2.3	36.0
Fraction 1						
F	79.4	4.0	67.7	13.8	97.6	10.7
B[b]F	71.2	6.3	68.5	11.7	86.7	15.5
B[a]P	74.2	1.9	57.3	10.9	95.6	19.1
Fraction 2						
F	17.2	17.6	18.9	34.1	nd	nd
B[b]F	14.7	4.2	20.5	30.1	6.7	8.8
B[a]P	17.3	0.6	21.7	26.2	9.1	22.9
Fraction 3						
F	nd	nd	nd	nd	np	np
B[b]F	2.4	5.6	3.1	12.2	np	np
B[a]P	3.8	68.1	3.2	8.1	np	np
Total SPE (fractions 1 + 2 + 3)						
F	96.7	6.0	86.6	3.6	97.6	10.7
B[b]F	88.4	5.1	92.1	2.0	93.5	14.9
B[a]P	95.4	1.3	82.3	1.4	104.7	17.8

Des rendements d'extraction acceptables ont pu être obtenus par utilisation du copolymère PS-DVB 0.5 g après réalisation d'une seule SPE, avec une bonne répétabilité (RSD variant de 1.3 à 6%). En effet, ces taux de récupération varient de 88.4 à 96.7%, par comparaison avec de 83.7 à 89.4% pour le PS-DVB 0.2 g précédemment. En revanche, cela entraîne une augmentation du volume d'élution, puisqu'une fraction importante des HAP se retrouve dans la seconde fraction d'élution (environ 15% contre moins de 5% pour une masse de 0.2 g), et que la présence des deux HAP les plus retenus est observée dans la troisième fraction d'élution (2.4% de B[b]F et 3.8% de B[a]P). Toutefois ces résultats semblent indiquer qu'une quatrième fraction n'est plus nécessaire.

En conclusion, ces résultats montrent que l'augmentation de la masse d'adsorbant permet d'améliorer les rendements tout en augmentant parallèlement le volume d'élution.

Une expérience complémentaire a également été réalisée pour mettre en évidence les effets de matrice, en effectuant la SPE sur de l'eau dopée. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3.12**. Les rendements obtenus en tenant compte de l'intervalle de confiance à 95%, sont de $86.6 \pm 7.8\%$ pour le fluoranthène, $92.1 \pm 4.6\%$ pour le benzo[b]fluoranthène et de $82.3 \pm 2.9\%$ pour le benzo[a]pyrène par comparaison avec $96.7 \pm 14.4\%$ pour le fluoranthène, $88.4 \pm 11.2\%$ pour le B[b]F et $95.4 \pm 3.1\%$ pour le B[a]P dans le cas du café boisson. Cette fois nous observons la tendance inverse qui avait été constatée pour le PS-DVB 0.2 g, puisque les taux de récupération sont sensiblement moins élevés avec l'eau dopée qu'avec le café boisson dopé. On peut expliquer ces résultats par une plus forte rétention des HAP sur le support en l'absence des constituants majeurs du café, et par suite les pertes observées seraient imputables à une élution incomplète. Ceci est d'ailleurs en accord avec la plus faible récupération observée pour le benzo[a]pyrène, composé le plus retenu sur le PS-DVB. En présence du café boisson, on peut penser que le support est en partie saturé par des constituants du café, ce qui diminuerait la rétention des HAP, rendant ainsi leur élution plus facile.

Ces résultats corroborent l'influence importante de la matrice de café sur les taux de récupération, ce qui justifie la nécessité de mettre au point les conditions de SPE sur des échantillons de café dopés. De plus, ils semblent indiquer que l'utilisation d'un adsorbant sur lequel les HAP seraient moins retenus pourrait s'avérer intéressante pour cette application. C'est la raison pour laquelle nous avons également testé la silice greffée octadécyle, sur laquelle les HAP sont moins retenus du fait de l'absence d'interactions par transfert de charge.

3.2.1.2 SPE sur silice greffée octadécyle

Des essais similaires ont donc été effectués sur une cartouche remplie de silice greffée octadécyle 0.5 g, afin de comparer ce support au PS-DVB, en présence de la matrice de café (cf chapitre 2 : expérience SPE-C18 3). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3.12** afin de les comparer aux précédents. La **Figure 3.26** illustre les taux de récupération moyens obtenus (i.e. somme des trois fractions d'élution).

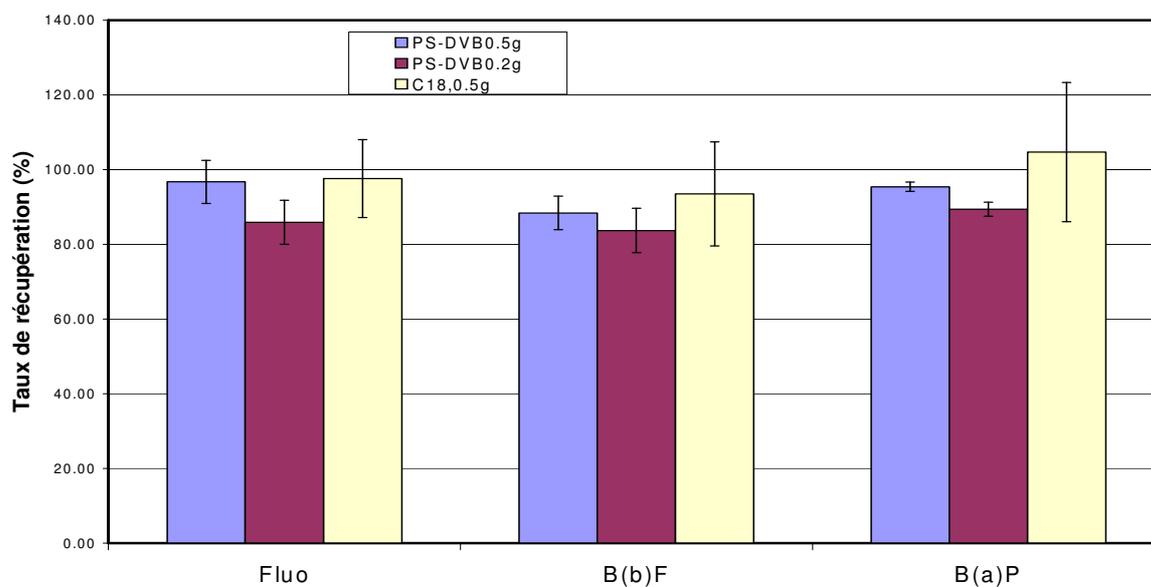


Figure 3.26 : Influence de la nature et de la masse d'adsorbant contenu dans la cartouche SPE sur la récupération après SPE des HAP contenus dans le café boisson ($n = 3$; taux de récupération moyens \pm écart-type).

On constate effectivement une moindre rétention des HAP sur ce support par comparaison avec le PS-DVB, puisque la grande majorité des HAP est récupérée avec la première fraction d'élution (rendements d'extraction variant de 86.7 à 97.6%). Cependant, on observe parallèlement que la répétabilité est moins bonne, les RSD variant de 10.7 à 17.8%. Une étude antérieure [Kayali-Sayadi et al. (1999)] fait mention de taux de recouvrement variant de 11 à 111% pour les HAP dans le café boisson dopé après SPE sur silice greffée (0.5 g), et élution avec l'éthyl éther ; cependant les quelques essais que nous avons menés dans les mêmes conditions n'ont pas été probants. Par conséquent, il est préférable de choisir le PS-DVB 0.5 g afin d'obtenir des rendements acceptables et répétables (RSD variant de 1.3% à 6%).

En conclusion, nous avons finalement retenu une étape d'extraction SPE sur cartouche de PS-DVB 0.5 g, avec une élution des HAP par le mélange MeOH/THF 10/90 (v/v) en 2 fractions d'élution de 2 mL chacune. Un exemple de chromatogramme obtenu dans ces conditions à partir d'un café boisson (dopé ou non) est donné sur la **Figure 3.27**.

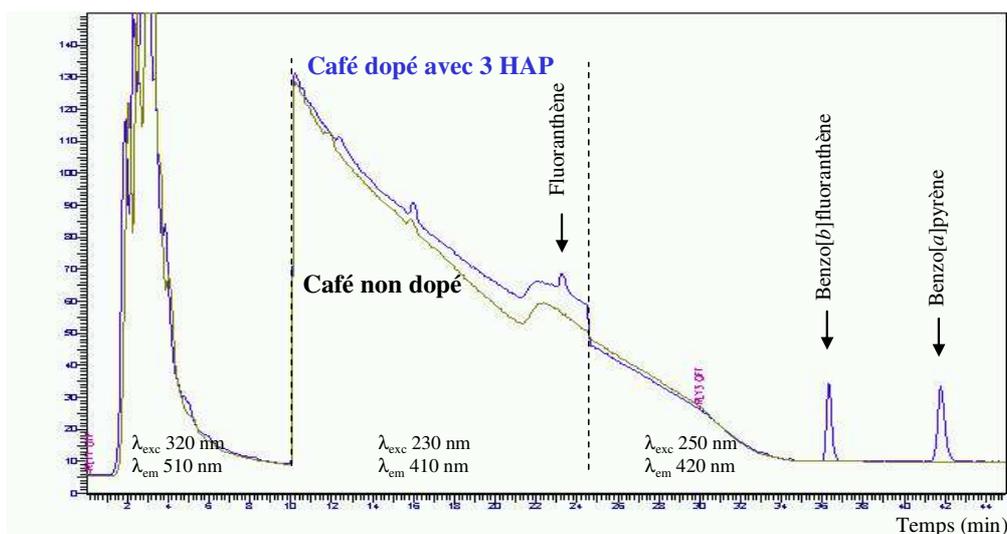


Figure 3.27 : Chromatogramme d'un extrait de café boisson (dopé et non dopé) obtenu par SPE sur PS-DVB 0.5 g – Café Mélange L'Or (lot P5, 23/10/03, 12 :26).

3.2.1.3 Influence d'une étape de lavage avant l'élution

Lors de la mise au point des conditions opératoires de l'extraction SPE, des essais ont été conduits sur l'intérêt et l'efficacité de la mise en œuvre d'une étape de lavage avant l'élution des HAP retenus sur le support. L'objectif était de pouvoir éliminer de façon sélective, par passage d'un solvant convenablement choisi (i.e. force éluante adaptée), les composés non désirés co-extraits contenus dans l'échantillon de café liquide, et susceptibles d'interférer avec les composés d'intérêt lors de l'analyse par HPLC, voire d'encrasser la colonne chromatographique. Ceci devrait donc permettre d'atteindre des taux de récupération quantitatifs plus fiables et reproductibles, ainsi qu'une meilleure résolution et/ou limite de détection grâce à l'obtention de chromatogrammes « moins chargés ».

Pour cela nous avons testé le lavage à l'eau, au méthanol et avec le mélange eau/MeOH 50/50 (v/v) (cf chapitre 2 : expérience SPE-DVB 5, 6 et 7). Tout d'abord, nous avons testé le lavage à l'eau et au méthanol sur du café Arabica dopé provenant de Colombie. Ainsi, après passage du café boisson dopé sur la cartouche, celle-ci est lavée avec 5 mL du solvant testé (eau ou MeOH) avant l'élution ultérieure des HAP avec trois fractions successives de 2 mL de MeOH/THF 10/90 (v/v) chacune. Les résultats obtenus pour chacune des fractions recueillies sont présentés dans le **Tableau 3.13**. Une représentation graphique en est donnée sur la **Figure 3.28**.

Tableau 3.13 : Influence d'une étape de lavage sur la récupération des 3 HAP étudiés après SPE sur PS-DVB 0.5 g.

Conditions expérimentales : Dopage café boisson (50 mL); rinçage (5 mL) ; élution avec MeOH-THF 10/90 (v/v) (3 fractions de 2 mL). nd : non détecté. * pour ce café, 1 seul essai a été réalisé par solvant de rinçage.

	Lavage à l'eau		Lavage au MeOH		Lavage à l'eau	Lavage avec eau-MeOH 50/50	Lavage au MeOH
	Expérience SPE-DVB 6 Café Colombie Lot 03-259		Expérience SPE-DVB 7 Café Colombie Lot 03-259		Expérience SPE-DVB 5 Café Ethiopie	Expérience SPE-DVB 5 Café Ethiopie	Expérience SPE-DVB 5 Café Ethiopie
	Moyenne (%)	RSD (%)	Moyenne (%)	RSD (%)	Récup.* (%)	Récup.* (%)	Récup.* (%)
Adsorption sur les parois du bécher							
F	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B[b]F	3.6	18.9	2.1	1.4	3.5	3.9	2.9
B[a]P	3.9	13.8	2.5	3.6	4.2	4.5	3.7
Fraction 1							
F	61.6	5.2	67.7	5.0	57.3	56.0	63.4
B[b]F	72.1	5.8	66.0	2.6	62.3	57.5	61.8
B[a]P	69.8	6.0	64.1	1.9	63.1	56.5	66.4
Fraction 2							
F	13.0	20.2	10.2	6.9	9.9	11.9	8.4
B[b]F	13.7	13.7	8.1	10.4	16.1	12.5	9.4
B[a]P	15.7	11.9	11.4	2.8	19.1	15.8	8.8
Fraction 3							
F	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B[b]F	3.3	39.2	2.8	33.5	2.7	2.2	2.4
B[a]P	4.5	30.3	6.0	86.1	3.7	3.4	2.4
Total SPE (fractions 1 + 2 + 3)							
F	74.6	4.3	77.8	3.4	67.2	67.9	71.9
B[b]F	89.1	2.2	77.7	2.9	81.1	72.2	73.6
B[a]P	90.1	1.3	81.9	5.7	85.8	75.7	77.6

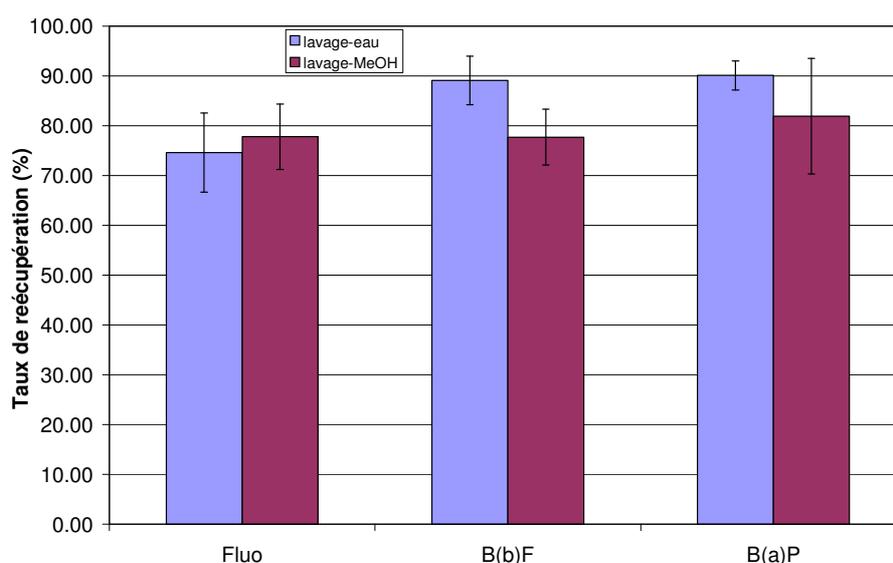


Figure 3.28 : Influence de la nature du solvant de lavage sur la récupération après SPE sur PS-DVB 0.5 g des HAP contenus dans le café boisson de Colombie (n = 3, taux de récupération moyens ± intervalles de confiance à 95%).

Ces résultats sont à comparer avec ceux obtenus dans les mêmes conditions, sans étape de lavage (cf **Tableau 3.12**), pour lesquels nous avons obtenu 96.7, 88.4 et 95.4% respectivement pour le fluoranthène, le benzo[*b*]fluoranthène et le benzo[*a*]pyrène. Dans le cas du lavage à l'eau, on observe une perte significative (environ 22%) pour le fluoranthène, composé le moins retenu sur le PS-DVB et le moins hydrophobe. Lorsque le lavage est effectué avec du méthanol, de force éluante plus élevée, on observe des pertes significatives pour les trois composés étudiés : 18.9, 10.7 et 13.5% respectivement pour le fluoranthène, le benzo[*b*]fluoranthène et le benzo[*a*]pyrène. On peut donc envisager de mettre en œuvre un solvant d'éluant de force éluante intermédiaire, tel que le mélange eau-MeOH 50/50 (v/v).

Par suite, dans la recherche d'un solvant convenable pour le lavage, nous avons à nouveau testé l'eau, le méthanol ainsi que le mélange eau/MeOH 50/50 (v/v), mais cette fois sur du café Arabica provenant d'Ethiopie. En effet, l'origine du café peut influencer sur la nature et la concentration des constituants du café, et donc sur l'efficacité de l'étape de lavage. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 3.13**, et illustrés graphiquement sur la **Figure 3.29**.

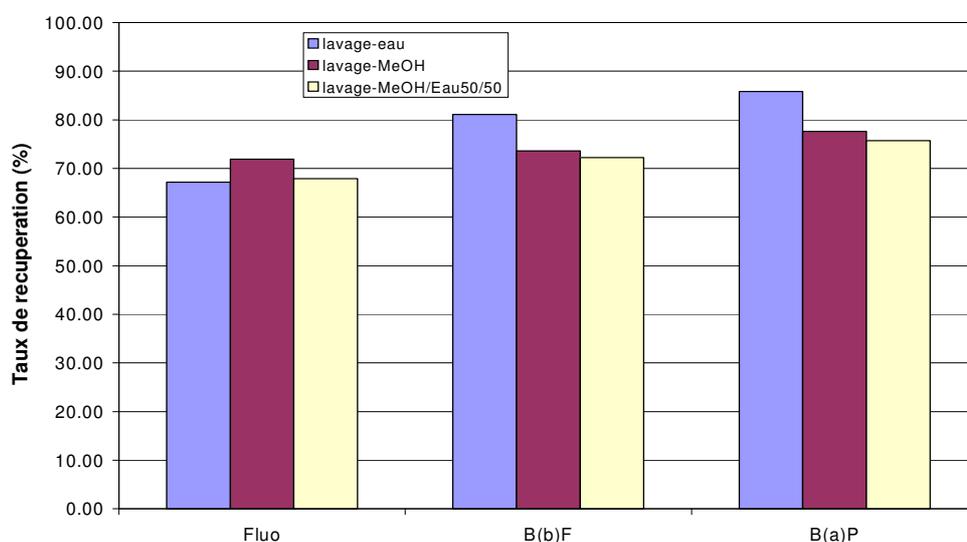


Figure 3.29 : Influence de la nature du solvant de lavage sur la récupération après SPE sur PS-DVB 0.5 g des HAP contenus dans le café boisson d'Ethiopie ($n = 1$, taux de récupération estimés).

On observe la même tendance que précédemment, à savoir une accentuation des pertes en HAP observées lorsque l'on passe d'un lavage à l'eau à un lavage au méthanol. Quant au mélange eau-MeOH 50/50 (v/v), il entraîne des pertes similaires à celles observées avec le méthanol seul.

En ce qui concerne le lavage à l'eau, il semble que dans le cas du café Ethiopie on ait une perte sensible à la fois pour le fluoranthène mais aussi pour les deux autres HAP testés. Même si ces résultats mériteraient d'être confirmés par des répétitions de ces expériences, ils laissent supposer l'importance de la matrice de café sur les résultats. Par conséquent il sera important de valider la méthode de SPE choisie sur divers échantillons de café, afin de prendre en compte ces effets de matrice possibles.

Au vu de ces résultats, nous avons choisi de ne pas conserver cette étape de lavage dans la procédure de SPE, pour éviter toute perte en fluoranthène ou autre HAP peu retenu sur le support. Les HAP sont donc directement élués de la cartouche PS-DVB 0.5 g avec le mélange MeOH/THF 10/90 (v/v) après percolation du café boisson sur le support.

3.2.2 Mise en œuvre de la méthode SPE retenue

Avant d'appliquer la méthode à des échantillons de café boisson, nous avons tout d'abord évalué ses performances, notamment en termes de limites de détection et de quantification. Ensuite nous avons appliquée la méthode à divers échantillons de café boisson dopés, afin d'évaluer la justesse et la précision et de tester la sensibilité aux effets de matrice. Enfin nous avons appliquée la méthode à la détermination des HAP dans des cafés boissons non dopés.

3.2.2.1 Evaluation des performances de la méthode SPE

Nous nous sommes attachés à évaluer les performances de la méthode SPE retenue. Plusieurs paramètres classiques ont été déterminés. Ainsi le domaine de linéarité a été estimé en analysant 12 solutions étalons dans la gamme de concentrations $0.4 - 50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (0.4, 1, 2, 2.5, 3.5, 5, 8, 10, 20, 25, 35 et $50 \mu\text{g.L}^{-1}$). Ceci permet de définir la droite de calibration pour chacun des HAP testés dans ce domaine de linéarité, et le coefficient de régression (r^2) correspondant. Les limites de détection et de quantification de la procédure analytique ont été estimées grâce à l'analyse de 7 blancs (i.e. injection de solvant), en prenant comme critère un rapport signal sur bruit de 3 pour la limite de détection (LOD) et de 10 pour la limite de quantification (LOQ) comme cela est classiquement réalisé. Ces limites sont appelées « limites analytiques » car elles font référence aux concentrations détectables ou quantifiables dans l'extrait final obtenu après l'extraction SPE. En tenant compte de la prise d'essai initiale de café boisson (50 mL) et du facteur d'enrichissement de la méthode (extrait final de 0.2 mL, soit un facteur d'enrichissement de 250), nous avons calculé les concentrations détectables ou quantifiables dans le café boisson. C'est ce que nous appelons « limites de la méthode ». Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3.14**.

Tableau 3.14 : Performances de la méthode SPE développée pour la détermination des HAP dans le café boisson.* y : aire du pic chromatographique, x : concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

Composé	Domaine de linéarité ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Droite de calibration*	r^2	LOD analytique ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LOQ analytique ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LOD méthode (ng.L^{-1})	LOQ méthode (ng.L^{-1})
F	2.5-50	$y = 34297 x + 68645$	0.9981	2.49	8.3	9.96	33.2
B[b]F	0.4-50	$y = 165129 x - 15240$	0.9993	0.33	1.11	1.32	4.44
B[a]P	0.4-50	$y = 276881 x - 21141$	0.9993	0.19	0.63	0.76	2.52

Ces valeurs sont satisfaisantes. Toutefois il est important de souligner qu'elles ont été estimées sur des blancs, et donc par conséquent les limites réelles dans des échantillons de café sont plus élevées en raison de composés interférents, particulièrement pour le fluoranthène. En outre, ces valeurs ont été minimisées en considérant que l'extrait final est concentré jusqu'à 0.2 mL. En pratique, nous avons usuellement analysé les fractions recueillies après SPE directement, sans concentration.

3.2.2.2 Application de la méthode SPE à différents échantillons de café dopés

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la matrice de café peut influencer sur les résultats de la SPE, notamment par la diversité des constituants majeurs du café selon l'origine de celui-ci. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à tester les conditions de SPE choisies sur différents échantillons de café dopés, afin de valider notre méthode, notamment en terme de reproductibilité et robustesse.

Outre les cafés précédemment étudiés, d'autres échantillons de cafés (provenant de différentes origines - mélange L'Or ou Colombie - et issus de différents lots) ont été étudiés en utilisant les conditions choisies (PS-DVB 0.5 g, élution avec MeOH/THF 10/90 (v/v)) lors de l'optimisation de la méthode. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **Tableau 3.15**. Pour améliorer la reproductibilité et l'exactitude, il aurait été préférable de combiner les trois fractions d'élution recueillies durant la SPE, et d'analyser l'extrait ainsi obtenu (éventuellement après concentration). Cela présentait en outre l'avantage de réduire le nombre d'échantillons à analyser et la durée d'obtention des résultats. Toutefois, nous avons préféré analyser chacune des fractions recueillies pour mieux appréhender le comportement des HAP au cours de cette extraction en phase solide.

Tableau 3.15 : Application de la procédure SPE retenue sur différents échantillons de café boisson dopés.

*Conditions expérimentales : Dopage café boisson (50 mL); PS-DVB 0.5 g ; élution avec MeOH-THF 10/90 (v/v) (3 fractions de 2 mL). nd : non détecté. * Pour ce café , le café boisson non dopé n'a pas été analysé.*

	Café Arabica Mélange L'Or Lot P6 18-09-04*		Café Arabica Mélange L'Or Lot P6 18-09-04*		Café Arabica Colombie Lot 03073 10/2003		Café Arabica Colombie Lot 03073 12/2003		Café Arabica Colombie Lot 03073	
	Analyse directe des fractions		Analyse des fractions après concentration		Analyse directe des fractions		Analyse directe des fractions		Analyse des fractions après concentration	
	Moyenne (%)	RSD (%)	Moyenne (%)	RSD (%)	Moyenne (%)	RSD (%)	Moyenne (%)	RSD (%)	Moyenne (%)	RSD (%)
Adsorption sur les parois du bécher										
F	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.2	10.5
B[b]F	3.1	1.9	1.7	27.5	3.0	17.3	4.1	20.2	2.8	16.3
B[a]P	2.6	9.6	1.5	32.8	2.9	23.0	4.9	22.9	2.8	15.9
Fraction 1										
F	79.4	4.0	70.0	5.5	62.7	13.4	65.0	23.8	95.5	5.0
B[b]F	71.2	6.3	65.9	5.6	64.3	2.1	73.8	10.8	63.0	30.8
B[a]P	74.2	1.9	69.1	3.0	65.5	4.3	78.7	8.7	73.3	32.6
Fraction 2										
F	17.2	17.6	14.0	30.8	28.9	1.5	16.5	9.1	4.6	90.4
B[b]F	14.7	4.2	17.0	35.0	23.6	21.2	18.4	11.0	0.6	428.1
B[a]P	17.3	0.6	19.9	28.4	30.3	18.7	21.0	4.7	3.0	71.5
Fraction 3										
F	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B[b]F	2.4	5.6	nd	nd	2.9	25.6	3.8	26.3	2.4	48.6
B[a]P	3.8	68.1	1.3	42.3	3.9	35.9	5.5	14.8	3.2	30.9
Total SPE (fractions 1 + 2 + 3)										
F	96.7	6.0	84.0	8.5	91.6	9.6	81.5	17.3	105.6	1.0
B[b]F	88.4	5.1	82.9	9.9	90.7	5.7	96.1	5.9	79.5	19.9
B[a]P	95.4	1.3	90.2	8.2	99.8	4.7	105.2	5.1	92.8	22.5

Dans un premier temps les fractions d'élution ont été analysées directement. On observe que, pour les trois échantillons considérés, la majeure partie des HAP est récupérée dans la première fraction (60 à 80%). La seconde fraction permet de récupérer environ 15 à 30% des HAP. Quant à la troisième fraction, seules des traces sont détectées pour les deux composés les plus retenus, le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène. Au final, les résultats obtenus sont satisfaisants car nous avons globalement des taux de récupération variant de 81.5 à 105.2%, avec une répétabilité acceptable.

Dans un deuxième temps nous avons repris les fractions précédentes afin de les concentrer jusqu'à environ 0.2-0.5 mL grâce à un barbotage sous courant d'azote. L'objectif attendu était d'améliorer la quantification des HAP, tout particulièrement dans la troisième fraction, et ainsi d'atteindre une meilleure justesse et répétabilité des résultats. On observe à l'inverse une moins bonne répétabilité, qui pourrait s'expliquer par la concentration des composés interférents.

En raison du manque de pertinence de ces résultats, nous avons par la suite choisi d'analyser directement les fractions recueillies lors de l'élution, sans concentration préalable. De plus, la réalisation d'une troisième fraction nous apparaît peu pertinente car elle rallonge la durée de l'extraction tout en récupérant seulement des traces en HAP. Par conséquent nous avons décidé par la suite de ne réaliser que deux fractions d'élution.

3.2.2.3 Application de la méthode à différents cafés boissons

Cette technique a été appliquée à l'analyse de différents cafés boissons non dopés afin de déterminer la concentration en HAP éventuellement présents dans ces échantillons. Ces expériences ont donc été réalisées sur des cafés d'origines différentes (mélange L'Or, Colombie, Ethiopie). Les HAP recherchés ont été quantifiés par HPLC-FD dans les fractions d'élution recueillies, leur identification se basant dans un premier temps sur leur temps de rétention (il s'agit donc pour l'instant d'une suspicion de la présence de ces composés). Les résultats obtenus sont consignés dans le **Tableau 3.16**.

Tableau 3.16 : Concentrations estimées pour les trois HAP modèles dans divers cafés boissons après extraction SPE.

*Conditions expérimentales : café boisson non dopé (50 mL) ; PS-DVB 0.5 g ; élution avec MeOH-THF 10/90 (v/v) (2 fractions de 2 mL). n : nombre d'essais réalisés ; nd : non détecté. * pour ce café, la SPE a été réalisée sur PS-DVB 0.2 g.*

	Café Arabica Mélange L'Or Lot P5 31-12-03 07:37 n = 2		Café Arabica Mélange L'Or Lot P6 18:26 n = 3		Café Arabica* Mélange L'Or Lot P5 12:26 n = 2		Café Arabica Colombie n = 3		Café Arabica Ethiopie n = 3	
	Moyenne (ng.L ⁻¹)	RSD (%)	Moyenne (ng.L ⁻¹)	RSD (%)	Moyenne (ng.L ⁻¹)	RSD (%)	Moyenne (ng.L ⁻¹)	RSD (%)	Moyenne (ng.L ⁻¹)	RSD (%)
Fraction 1										
F	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B[b]F	38.4	31.7	24.0	29.8	75.8	44.0	nd	nd	nd	nd
B[a]P	65.3	54.4	34.1	54.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fraction 2										
F	nd	nd	nd	nd	np	np	nd	nd	nd	nd
B[b]F	28.2	23.1	11.1	16.3	13.9	5.1	nd	nd	nd	nd
B[a]P	30.4	37.2	8.9	91.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total SPE (fractions 1 + 2)										
F	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B[b]F	66.6	28.0	35.1	20.1	89.7	38.0	nd	nd	nd	nd
B[a]P	95.7	48.9	42.9	61.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Plusieurs observations peuvent être faites concernant ces résultats. En premier lieu on constate une grande variabilité de la teneur en benzo[b]fluoranthène et benzo[a]pyrène dans les cafés boissons. Ainsi, aucune trace de ces deux composés n'a pu être mise en évidence dans les cafés Colombie et Ethiopie, alors que les concentrations estimées dans le mélange

L'Or varie de 35.1 à 89.7 ng.L⁻¹ pour le benzo[*b*]fluoranthène et de 42.9 et 95.7 ng.L⁻¹ pour le benzo[*a*]pyrène. Si l'on se réfère aux valeurs reportées dans la littérature pour ce dernier composé, celles-ci varient de 0 à 10 ng.L⁻¹ [De Kruijf et al. (1987b) ; Maier (1991)]. Pour expliquer ces différences on peut suspecter une surestimation des concentrations que nous avançons, et ce pour deux raisons : (1) la présence de composés co-éluant, d'où la nécessité d'une confirmation de la présence des HAP, (2) la grande dispersion de nos résultats liée au fait que les concentrations déterminées sont voisines des limites de quantification de la méthode car les fractions n'ont pas été concentrées avant analyse.

En second lieu, il est également intéressant de mentionner la grande différence obtenue entre les lots de café de même origine (i.e. mélange L'Or). D'où la nécessité d'effectuer des analyses régulières pour déterminer la teneur en HAP dans le café boisson. Ces variations entre lots peuvent être imputables à une contamination différente en HAP xénobiotiques lors du séchage des grains de café par exemple, ou à des conditions de torréfaction différentes (en terme de durée et de température) ayant conduit à diverses concentrations en HAP néoformés. Comme nous l'avons déjà mentionné, cette étape de torréfaction fera l'objet d'une étude approfondie dans le chapitre 4 de ce mémoire.

Enfin, aucune trace de fluoranthène n'a pu être mise en évidence dans nos échantillons de café boisson, ce qui va à l'encontre des résultats de Kayali-Sayadi et al. (1999) qui ont estimé des concentrations de fluoranthène dans le café boisson variant de 0.74 à 2.27 ng.L⁻¹. Compte tenu de la limite de détection élevée de notre méthode (environ 10 ng.L⁻¹ comme indiqué dans le **Tableau 3.14**), il est raisonnable de penser que les traces de fluoranthène présentes dans nos échantillons n'ont pu être détectées par notre méthode. Cette difficulté dans la détermination de ce composé est d'autant plus marquée que le pic chromatographique n'est pas bien résolu en raison d'un massif interférent important comme illustré sur la **Figure 3.30**. Il sera donc nécessaire d'envisager par la suite une étape de purification de l'extrait pour éliminer certains constituants de la matrice de café, et permettre ainsi la détection de traces en HAP les plus volatils. On pourrait également envisager le remplacement de la boucle d'injection du système HPLC, qui est de 20 µL, par une boucle de 50 µL afin d'abaisser la limite de quantification.

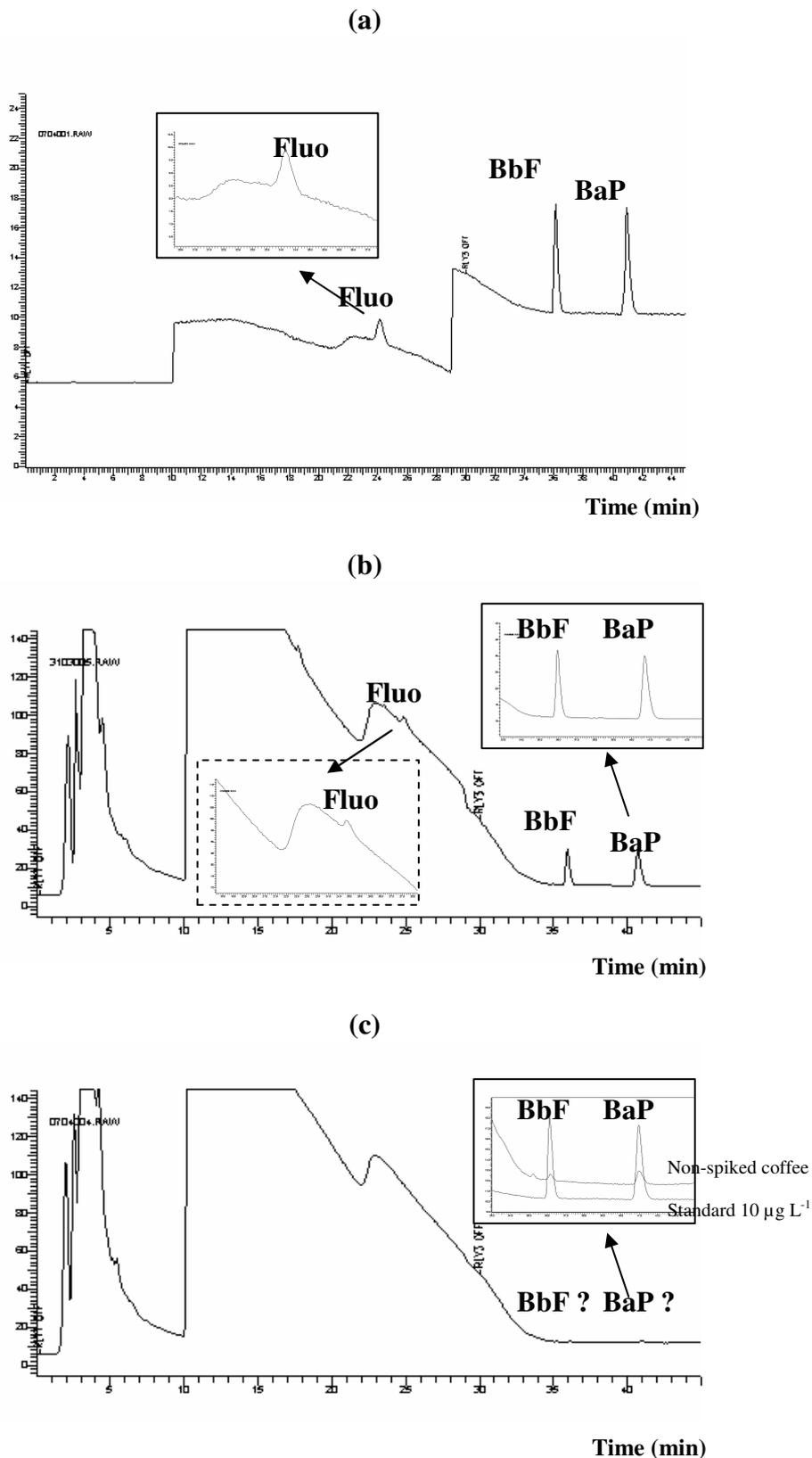


Figure 3.30 : Exemples de chromatogrammes obtenus par HPLC-FD*.

(a) solution étalon des 3 HAP à $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; (b) café boisson dopé avec les 3 HAP, chacun à $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; (c) café boisson non dopé. *Détection par fluorescence – 0-10 min 320/510 nm ; 10-29 min 230/410 nm; 29-55 min 250/420 nm.

Au vu de ces résultats, nous avons tenté de confirmer la présence des HAP dans les cafés boissons par une analyse HPLC-UV-DAD. Pour ce faire, les extraits ont été concentrés jusqu'à environ 0.2-0.5 mL sous courant d'azote, en raison de la moindre sensibilité du détecteur UV. La **Figure 3.31** présente la comparaison d'un chromatogramme et des spectres UV obtenus pour une solution étalon avec ceux obtenus pour un échantillon de café boisson. Un ajout dosé effectué dans l'extrait de café a confirmé l'attribution des pics affectés aux HAP. Malgré tout, les spectres UV obtenus n'ont pu confirmer la présence des HAP, probablement en raison du manque de sensibilité et de la présence de constituants du café modifiant l'allure des spectres UV. Par conséquent il nous a semblé nécessaire de mettre en œuvre une étape supplémentaire de purification. Aussi avons-nous étudié l'efficacité d'une étape de saponification du café boisson.

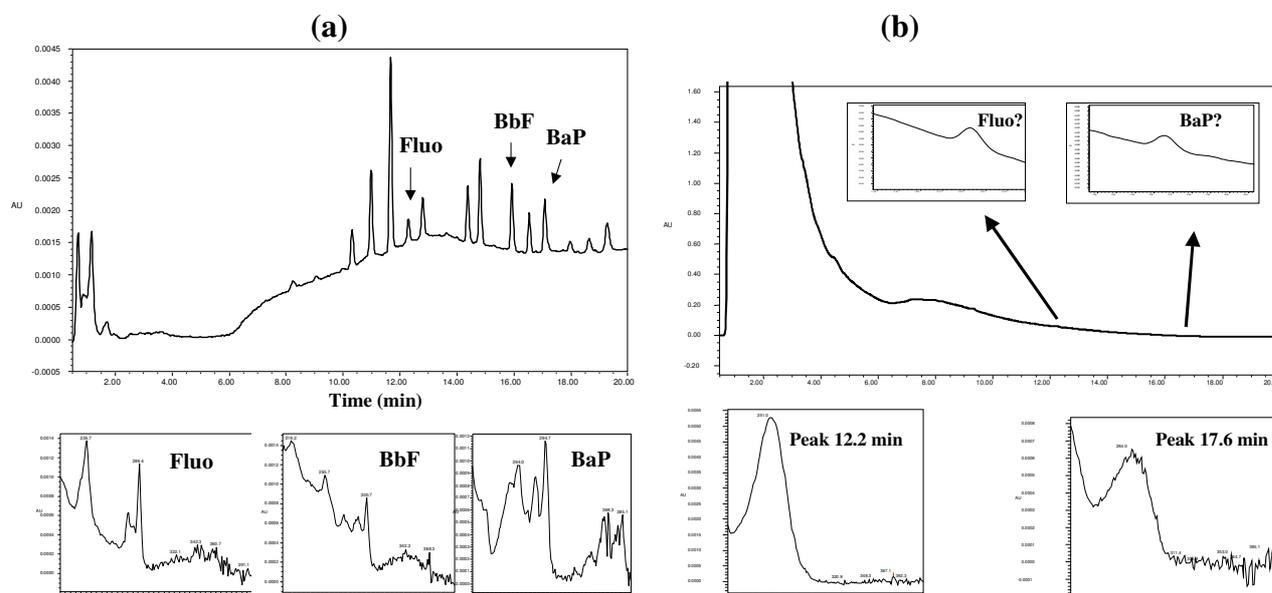


Figure 3.31 : Exemples de chromatogrammes obtenus par HPLC-UV-DAD (à 254 nm) et spectres UV de quelques pics.

(a) solution étalon des 16 HAP à 25 µg.L⁻¹; (b) café boisson non dopé (mélange L'Or lot P5 31-12-03 07 :37).

3.2.3 Etude de la mise en œuvre d'une étape de saponification

Nous avons choisi de mettre en œuvre la méthode classique de saponification éthanolique, suivie d'une extraction liquide-liquide puis d'une purification par SPE sur silice puisque cette procédure analytique a donné des résultats probants pour les extraits de café moulu. Les expériences, réalisées sur du café boisson dopé et non dopé pour la mise en évidence des 16

HAP, ont conduit aux résultats présentés dans le **Tableau 3.17**. Au cours de ces essais nous avons opéré avec 200 mL de café boisson.

Tableau 3.17: Taux de récupération des HAP* après saponification d'un échantillon de café boisson dopé (café Colombie lot-04036-05/02/2006), suivie d'un partage liquide-liquide et d'une purification par SPE sur silice : valeurs moyennes, écarts-types absolus (SD) et relatifs (RSD), et intervalles de confiance à 95%. * sur les 16 HAP, seuls 13 composés fluorescents dans les conditions de détection fixées ; le naphthalène, l'acénaphthylène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène ne sont donc pas détectés.

Composé	Moyenne (%)	SD	RSD (%)	I.C. à 95%
Acénaphthène	45.0	9.3	20.8	23.2
Fluorène	43.0	16.7	38.8	41.4
Phénanthrène	94.4	6.1	6.4	15.1
Anthracène	84.7	6.7	7.9	16.7
Fluoranthène	96.6	19.9	20.6	49.4
Pyrène	88.8	17.0	19.1	42.2
Benzo[a]anthracène	85.1	13.2	15.5	32.8
Chrysène	81.7	16.4	20.1	40.7
Benzo[b]fluoranthène	79.8	15.5	19.4	38.5
Benzo[k]fluoranthène	84.3	11.8	14.0	29.3
Benzo[a]pyrène	82.1	13.4	16.3	33.2
Dibenzo[a,h]anthracène	52.7	14.5	27.5	36.0
Benzo[g,h,i]pérylène	45.7	9.9	21.5	24.5

Les rendements d'extraction varient de 43 à 96.6%. Dans l'ensemble, ces résultats sont répétables et satisfaisants, sauf pour le fluorène (43%), l'acénaphthène (45%), le dibenzo[a,h]anthracène (52.7%) et le benzo[g,h,i]pérylène (45.7%). Concernant le fluorène et l'acénaphthène, il est possible que ces faibles taux de récupération soient dus à une mauvaise quantification, de par la présence d'interférents qui sortent au voisinage des temps de rétention de ces deux pics (voir **Figure 3.32**). Pour les deux autres composés, plus hydrophobes, on peut supposer que l'élution de ces composés a été insuffisante lors de la SPE.

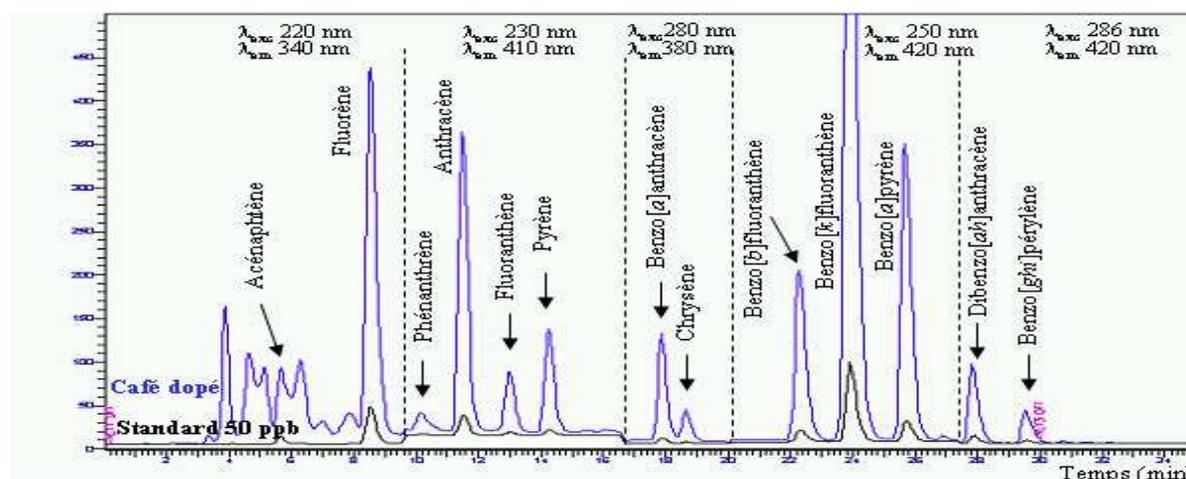


Figure 3.32 : Comparaison d'un chromatogramme de café boisson dopé saponifié et d'une solution standard des 16 HAP.

On constate que cette procédure de traitement du café boisson permet de limiter considérablement la présence de composés gênants sur le chromatogramme. Aussi avons-nous décidé de la retenir par la suite mais en faisant la saponification sur seulement 50 mL café boisson.

3.2.4 Conclusion

L'extraction en phase solide étant simple et rapide, cette méthode a été développée pour permettre la détermination des HAP dans le café boisson, notamment le fluoranthène, le benzo[*b*]fluoranthène et le benzo[*a*]pyrène. La pré-concentration des composés sur 0.5 g de copolymère styrène-divinylbenzène, suivie d'une élution avec le mélange MeOH/THF 10/90, d'une concentration de l'extrait final puis d'une analyse en HPLC-FD, permet d'atteindre des taux de récupération très satisfaisants et répétables. Cependant de nombreux composés interférents subsistent. Par conséquent nous avons finalement retenu une voie de traitement similaire à celle réalisée pour le café moulu, à savoir une saponification de la boisson, suivie d'un partage liquide-liquide et d'une purification par SPE sur silice. Bien que plus longue et contraignante, cette procédure analytique offre un extrait plus propre avec des taux de récupération satisfaisants pour la plupart des HAP étudiés.

3.3 *Estimation des coefficients de transfert des HAP du café moulu vers le café boisson*

La détermination des HAP dans le café moulu n'est qu'une première étape dans l'évaluation des risques. Il convient également d'évaluer les pourcentages de transfert des HAP du café moulu vers le café boisson, puisque c'est ce dernier qui est effectivement ingéré par le consommateur. Pour ce faire nous avons donc analysé les HAP dans divers cafés boissons obtenus à partir des cafés moulus d'origines différentes. Nous avons conservé pour cela le même mode de préparation du café boisson que précédemment, avec le même rapport masse de café moulu / volume d'eau percolé (50 g / 300 mL).

L'évaluation du pourcentage de transfert a été réalisée comme indiqué ci-dessous :

C_{moulu} : concentration du composé dans le café moulu ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

C_{liquide} : concentration du composé dans le café liquide ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

M_{moulu} : masse du composé dans les 50 g de café moulu ; $M_{\text{moulu}} (\text{ng}) = C_{\text{moulu}} \times 50$

M_{liquide} : masse du composé dans les 200 mL de café boisson analysé ; $M_{\text{liquide}} (\text{ng}) = C_{\text{liquide}} \times 200$

Proportion du composé transférée du café moulu vers le café boisson : $C_{\text{liquide}} \times 200 / C_{\text{moulu}} \times 50$

Le pourcentage de transfert est donc : $100 \times C_{\text{liquide}} \times 200 / C_{\text{moulu}} \times 50$, soit $400 \times C_{\text{liquide}} / C_{\text{moulu}}$

Les résultats concernant les concentrations en HAP estimées dans les cafés boissons testés ainsi que les coefficients de transfert correspondant sont présentés dans le **Tableau 3.18**.

Tableau 3.18 : Concentrations moyennes ($\mu\text{g.L}^{-1}$) estimées pour les HAP dans différents cafés boissons, et coefficients de transfert C_t correspondants. (les LOD ont été estimées en se basant sur les LOD analytiques dans l'extrait de 0.4 mL précédemment évaluées, et en considérant la prise d'essai de 50 mL de café boisson).

* Les résultats pour l'acénaphène et le fluorène sont donnés à titre indicatif.** 1 seul essai pour ce café.

	Kénya			Colombie**		Chine		
	C_{liquide} ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)	C_t (%)	C_{liquide} ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	C_t (%)	C_{liquide} ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)	C_t (%)
Ace*	nd	nd	0.00	nd	nd	nd	nd	nd
Fluorene*	0.049	2.27	5.78	nd	nd	traces	----	--
Phen	0.215	24.30	32.09	0.795	35.73	0.29	14.46	10.04
Anthr	traces	----	----	0.058	12.96	traces	----	----
F	0.33	16.44	18.49	1.230	30.67	0.37	5.02	11.53
Pyr	0.12	28.13	13.22	0.526	21.74	0.15	4.15	12.22
B[a]A	0.02	14.50	57.14	0.014	5.77	traces	----	----
Chrys	0.018	23.64	5.29	0.253	39.84	0.084	15.20	1.84
B[b]F	nd	nd	0.00	nd	nd	traces	----	----
B[k]F	0.026	0.77	40.00	traces	----	0.025	0.22	83.33
B[a]P	nd	nd	0.00	nd	nd	nd	nd	Nd
DB[ah]A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
B[ghi]P	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
$\Sigma 13\text{HAP}$	0.78			2.88		0.95		
$\Sigma 11\text{HAP}$	0.73			2.88		0.93		
$\Sigma \text{HAP toxiq}$	0.40			1.56		0.49		
$\Sigma \text{HAP carcin}$	0.06			0.27		0.12		
TEQ (13HAP)	0.01			0.02		0.01		
TEQ (11HAP)	0.01			0.02		0.01		

Nous avons tenté de voir si les pourcentages de transfert des HAP pouvaient être corrélés à leur solubilité dans l'eau, en se basant sur $1/\log K_{ow}$ (K_{ow} étant le coefficient de partage octanol-eau du composé). En effet, bien que la matrice solide et le mode de préparation de la boisson diffèrent, il a été récemment montré que le pourcentage de transfert des HAP contenus dans des feuilles de thé vers le thé boisson pouvait être corrélé à $1/\log Kow$ [Lin et al. (2005)].

Pour cela nous avons éliminé les valeurs pour lesquelles les concentrations en HAP dans le café moulu et boisson sont proches des limites de détection (ex : benzo[k]fluoranthène et benzo[a]pyrène pour les 3 cafés). Les résultats ne sont pas très probants, comme illustré sur la

Figure 3.33. On observe malgré tout une tendance à l'augmentation des pourcentages de transfert lorsque K_{ow} diminue.

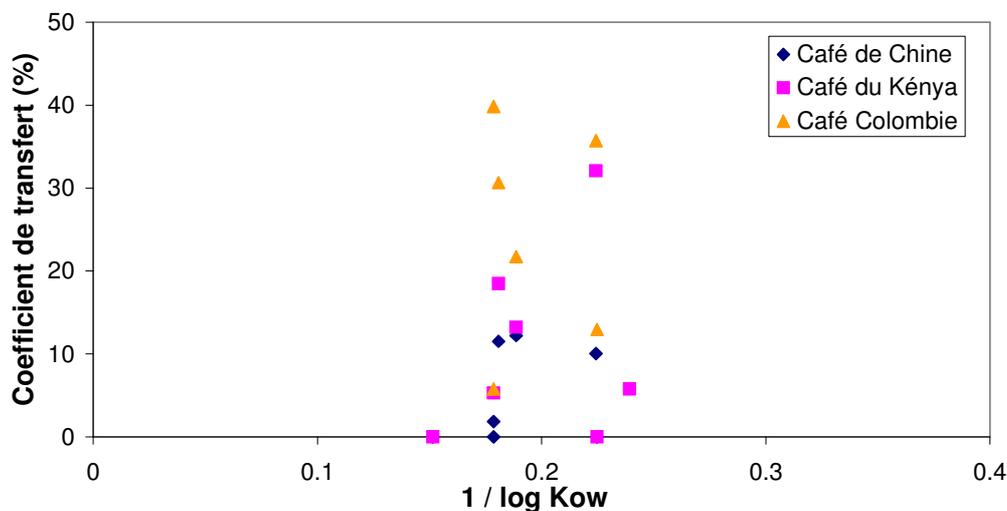


Figure 3.33 : Tentative de corrélation entre les coefficients de transfert estimés et l'inverse du logarithme du coefficient de partage octanol-eau des HAP (cafés de Chine, Kenya et Colombie).

Outre le caractère hydrophobe des HAP, d'autres paramètres sont susceptibles d'influer sur le pourcentage de transfert, ce qui pourrait justifier la faible corrélation observée. On peut citer notamment la composition du café moulu (par exemple sa teneur en caféine ou en acides), et sa teneur en HAP (par des phénomènes de saturation de la boisson en cas de concentrations élevées). Nous avons donc tracé les courbes $C_t \times C_{moulu}$ ou C_t / C_{moulu} en fonction de $1/\log K_{ow}$, mais aucune relation n'a pu être établie.

3.4 Conclusion

Les procédures analytiques mises au point ont permis l'analyse de plusieurs HAP dans des échantillons de café moulu et de café boisson. L'étape de saponification, bien que longue et contraignante, est nécessaire pour éliminer de nombreux composés interférents. Ainsi nous avons pu déterminer les concentrations en HAP de divers échantillons de café, et évaluer l'équivalent toxique. Même si une variabilité importante est observée selon l'origine et le lot du café, certains HAP sont majoritairement présents, tels que le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène. On note aussi la présence de benzo[a]anthracène, ce qui est préoccupant car il s'agit d'un probable carcinogène. Pour les autres composés carcinogènes, tels que le benzo[a]pyrène ou le dibenzo[a,h]anthracène, leurs teneurs dans le café sont infimes, voisines des limites de détection de nos méthodes. Toutefois, ces composés sont susceptibles de se former pour des torrifications prolongées à haute température. La seconde partie de ce travail concerne donc l'étude des conditions de torrification sur les concentrations en HAP du café.

- **Chapitre 4:**

Influence de la torréfaction sur la présence des HAP dans le café

4 INFLUENCE DE LA TORREFACTION SUR LA PRESENCE DES HAP DANS LE CAFE

4.1 Introduction

Après avoir montré l'existence des HAP tant dans le café moulu que dans le café liquide, il était important de savoir à quel niveau de la chaîne de production pouvaient se former ces HAP. Sachant que l'une des sources majeures de contamination des denrées alimentaires par les HAP est liée aux procédés de traitement thermique des aliments (grillade, torréfaction, etc.), nous nous sommes intéressés à l'étape de torréfaction afin d'étudier l'influence de la température (180, 200, 220, 240, 250 et 260°C) et de la durée (5, 8, 10, 13, 15 et 20 min) sur les teneurs en HAP du café. Nous avons également évalué la teneur en HAP dans les cafés verts considérés afin d'évaluer la part en HAP provenant d'une contamination exogène des grains. A partir de ces différentes données nous avons évalué l'équivalent toxique du mélange des HAP selon la recommandation de l'AFSSA [Afssa-Saisine n°2000-SA-0005] dans le café moulu et dans le café liquide, ainsi que les coefficients de transfert de chaque HAP.

4.2 Etude des conditions de torréfaction sur la teneur en HAP du café moulu

L'étude des conditions de torréfaction a été réalisée sur un torréfacteur pilote à lit fluidisé. Les conditions de torréfaction étudiées sont, d'une part la température (il s'agit de la température de l'air entrant dans le torréfacteur) et la durée. D'autres paramètres auraient été intéressants à étudier, tels que la quantité de café torréfiée ou le type de torréfacteur utilisé, mais nous n'avons pu le faire par manque de temps.

Nous avons utilisé deux voies d'approche parallèles : (a) nous avons tout d'abord fixé la température de l'air entrant (à 260°C) afin d'étudier l'influence de la durée de torréfaction, de manière à appréhender les cinétiques de formation ou dégradation des HAP recherchés, (b) ensuite nous avons étudié l'influence de la température de torréfaction sur les teneurs en HAP du café moulu pour deux durées de torréfaction (5 et 20 min). Au cours de cette étude, deux échantillons de café vert, provenant de Cuba, ont été torréfiés. Après torréfaction les échantillons de café sont moulus avant de subir une saponification, suivie d'une extraction au cyclohexane, d'une purification par SPE sur silice, et enfin d'une analyse par HPLC-FD.

4.2.1 Influence de la durée de torréfaction à 260 °C

Dans cette étude, nous avons torréfié les grains de café vert à 5, 8, 10, 13, 15 et 20 min. Nous avons tout d'abord quantifié les HAP recherchés dans les différents échantillons de café, avant de nous intéresser aux cinétiques de formation de certains HAP.

4.2.1.1 Concentrations estimées en HAP dans le café vert et le café torréfié

Les concentrations estimées pour les 16 HAP recherchés sont indiquées dans le **Tableau 4.1**. Sont données également dans ce tableau les concentrations estimées pour la somme des 13 HAP recherchés, la somme des 11 HAP (i.e. sans tenir compte de l'acénaphthène et du fluorène pour lesquels des composés interférents sont présents lors de l'analyse HPLC-FD), la somme des HAP toxiques analysés (i.e. anthracène, fluoranthène, benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène, dibenzo[ah]-anthracène et benzo[ghi]pérylène) et la somme des HAP carcinogènes (i.e. benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène, dibenzo[ah]anthracène et benzo[ghi]pérylène). De plus nous avons estimé l'équivalent toxique (TEQ) pour la somme des 13 ou 11 HAP, en pondérant la concentration de chaque HAP par son facteur d'équivalent toxique (TEF) comme détaillé dans l'**annexe 7**.

On constate que dans le café vert et torréfié, les HAP majeurs sont le phénanthrène et le pyrène, non toxiques, ainsi que le fluoranthène, toxique. Les deux composés les plus toxiques, le benzo[a]pyrène et le dibenzo[ah]anthracène sont présents seulement à l'état de traces. Il apparaît également qu'à cette température de torréfaction élevée certains HAP se forment de manière significative durant la torréfaction : l'acénaphthène, le fluorène, le pyrène, le benzo[a]anthracène, le phénanthrène et le chrysène.

Si on considère la somme des 11 HAP, elle croît de façon graduelle avec la durée de torréfaction, passant de 20.86 à 117.45 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ entre 0 et 20 min respectivement, principalement en raison de la formation de composés à 4 cycles : le pyrène (53.05 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ à 20 min), le fluoranthène (17.54 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ à 20 min), le benzo[a]anthracène (12.67 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ à 20 min), et le chrysène (12.82 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ à 20 min). Le phénanthrène, composé à 3 cycles, contribue également fortement à la somme des HAP (17.37 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ à 20 min). La **Figure 4.1** illustre les contributions respectives des HAP à 3, 4, 5 et 6 cycles, à la somme des HAP.

Tableau 4.1 : Influence de la durée de torréfaction (pour une température de l'air entrant de 260°C) sur les teneurs en HAP du café moulu.

nd : non détecté (valeurs inférieures aux LOD estimées).

	Durée de torréfaction à 260°C													
	Café vert ENSIA		5 min		8 min		10 min		13 min		15 min		20 min	
	Conc. (µg.kg ⁻¹)	RSD (%)												
Ace*	nd	-----	3.17	31.41	4.50	2.18	5.95	10.15	5.39	49.62	7.45	2.24	8.69	11.42
Fluorene*	traces	-----	nd	-----										
Phen	8.89	9.72	8.39	17.14	12.83	5.15	13.32	6.26	13.53	10.37	12.21	7.90	17.37	5.26
Anthr	0.68	7.49	1.80	7.21	2.03	7.33	1.90	4.75	1.10	17.60	1.61	7.20	2.17	14.85
F	6.85	3.90	10.98	10.08	9.64	0.14	11.04	4.60	11.87	3.75	13.13	13.11	17.54	11.03
Pyr	3.27	15.14	6.60	15.83	7.94	10.30	13.16	3.42	22.0	5.08	25.74	19.30	53.05	11.47
B[a]A	0.20	41.52	3.86	13.80	5.08	9.09	7.93	19.58	9.57	14.04	10.29	17.18	12.67	9.42
Chrys	0.45	9.75	1.58	20.0	3.09	19.71	3.49	39.59	7.65	8.65	7.74	32.95	12.82	13.43
B[b]F	0.27	13.36	0.43	21.03	nd	-----	nd	-----	traces	-----	traces	-----	traces	-----
B[k]F	traces	-----	0.17	14.85	traces	-----	traces	-----	traces	-----	traces	-----	nd	-----
B[a]P	traces	-----	0.20	31.63	traces	-----								
DB[ah]A	nd	-----	0.37	31.65	nd	0.00	traces	-----	nd	-----	traces	-----	nd	-----
B[ghi]P	nd	-----	0.78	24.13	0.45	20.63	0.86	13.04	nd	-----	1.02	50.99	1.71	36.49
Σ 13 HAP	21.17		38.33		45.7		57.87		71.26		79.65		126.16	
Σ 11 HAP	20.86		35.16		41.2		51.92		65.87		72.2		117.45	
Σ HAP toxiq	8.70		20.17		20.43		25.44		30.34		34.25		47.05	
Σ HAP carcin	1.17		7.39		8.76		12.5		17.35		19.51		27.34	
TEQ (13 HAP)	0.26		1.17		0.72		1.08		1.18		1.53		1.63	
TEQ (11 HAP)	0.26		1.17		0.72		1.08		1.18		1.53		1.62	

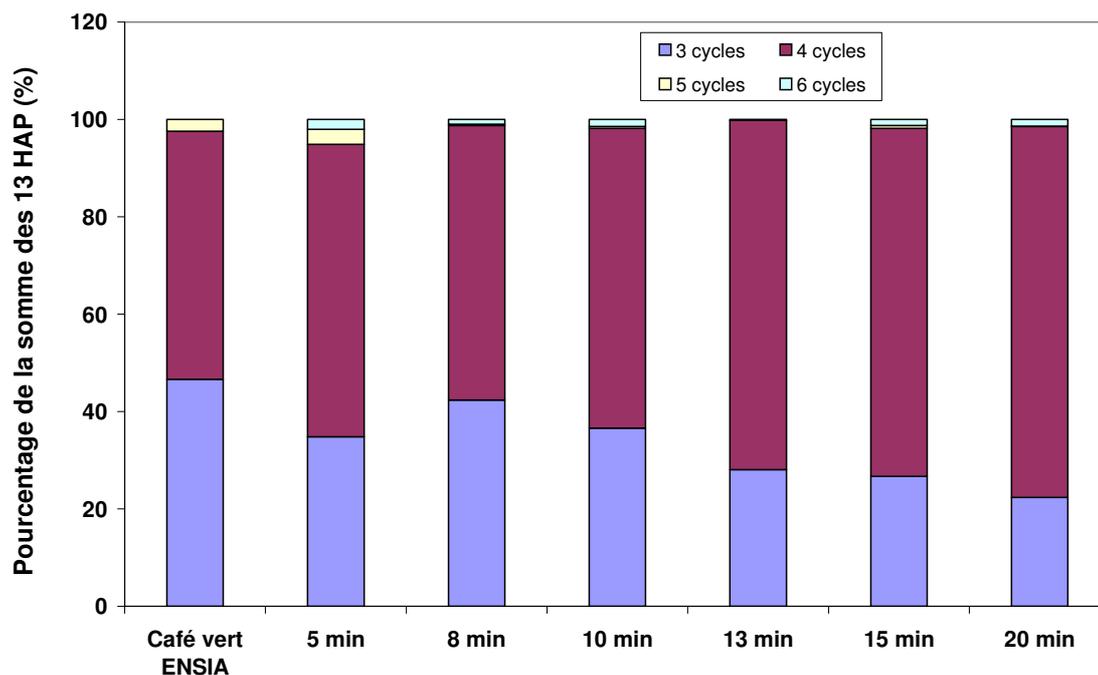


Figure 4.1 : Répartition des HAP selon leur nombre de cycles pour une torréfaction de durée variable avec une température de l'air entrant de 260°C, et comparaison avec la composition du café vert.

On peut donc constater que les composés à 3 et 4 cycles sont dominants, à la fois dans le café vert et le café torréfié ; l'ensemble de ces composés représente 94.9 à 99.8% de la somme totale des HAP quantifiés dans chaque échantillon. Cependant on note une tendance à une diminution des HAP à 3 cycles durant la torréfaction, au profit des HAP à 4 cycles. En effet, à partir de 8 min, les composés à 3 cycles diminuent progressivement (42.36 à 22.37%) jusqu'à 20 min, et parallèlement les composés à 4 cycles augmentent (56.35 à 76.15%). On observe aussi la présence significative d'un composé toxique à 6 cycles, le benzo[ghi]pérylène (0.45 à 1.71 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). En revanche, les HAP à 5 cycles (benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène et dibenzo[ah]anthracène) sont présents seulement à l'état de traces. Ainsi, les concentrations estimées en benzo[a]pyrène varient de non détecté à 0.20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dans le café torréfié, avec 0.12 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ estimée pour le café vert ; ces valeurs sont cohérentes avec celles reportées par De Kruijf et al. (1987b) (0.1 à 0.5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

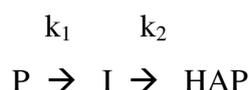
4.2.1.2 Etude des cinétiques de formation des HAP

Comme mentionné dans le chapitre 1, le(s) mécanisme(s) exact(s) de la formation des HAP sont très complexe(s) et non connu(s). Toutefois les études portant sur la formation des HAP durant la pyrolyse de composés précurseurs mettent en évidence la formation de composés intermédiaires ; en outre la dégradation de certains précurseurs a souvent été reportée comme

étant d'ordre 1. Ainsi Casal et al. (2000) ont observé que la dégradation de la trigonelline au cours de la torréfaction (importante après 200°C) suit une cinétique d'ordre 1, avec une constante de vitesse estimée à 0.344 min⁻¹.

4.2.1.2.1 Proposition d'un modèle simplifié et hypothèses de base

On peut proposer un mécanisme simplifié pour la formation des HAP, basé sur deux réactions unimoléculaires totales successives, la première étant d'ordre 1 et la seconde d'ordre m :



avec P : précurseur, I : intermédiaire, k_1 : constante cinétique de la 1^{ère} réaction, k_2 : constante cinétique de la seconde réaction. On pose : $[X]_0$: concentration de X au temps $t = 0$; $[X]$: concentration de X au temps t.

On peut donc écrire :

$$d[P]/dt = -k_1 \cdot [P]$$

$$d[I]/dt = k_1 \cdot [P] - k_2 \cdot [I]^m$$

$$d[\text{HAP}]/dt = k_2 \cdot [I]^m$$

On peut alors formuler plusieurs hypothèses quant à l'ordre m de la seconde réaction.

○ Hypothèse H1 : réaction 1 très rapide et réaction 2 avec une cinétique d'ordre 0

On obtient une concentration en HAP formé indépendante de la concentration de l'intermédiaire, et donc une teneur en HAP proportionnelle au temps de torréfaction :

$$[\text{HAP}] = [\text{HAP}]_0 + k_2 \cdot t$$

La courbe $[\text{HAP}] = f(t)$ est donc une droite de pente k_2 . On peut éventuellement observer une période d'induction au départ, liée au fait que l'intermédiaire doit être formé, comme cela a été observé lors de la formation des aldéhydes de Strecker [Cremer et Eichner (2000)].

○ Hypothèse H2 : réaction 1 très rapide et réaction 2 avec une cinétique d'ordre 1

Après la période d'induction nécessaire à la formation de l'intermédiaire, le produit I est en concentration importante dans le milieu, et en supposant que le réactif P a quasiment disparu on peut écrire :

$$d[I]/dt = -k_2 \cdot [I]$$

$$\text{Ln}([I]/[I]_0) = -k_2 \cdot t$$

$$[I] = [I]_0 \cdot \exp(-k_2 t)$$

Comme P a très rapidement disparu, on peut écrire :

$$[\text{HAP}] = [I]_0 - [I]$$

$$[\text{HAP}] = [I]_0 (1 - \exp(-k_2 t))$$

Il s'agit ici de la concentration en HAP formé par voie endogène, donc en toute rigueur il convient de soustraire à la concentration en HAP au temps t la concentration au temps zéro afin de ne pas tenir compte de la contamination par voie exogène.

○ Hypothèse H3 : réaction 1 très rapide et réaction 2 avec une cinétique d'ordre 2

Après la période d'induction nécessaire à la formation de l'intermédiaire, le produit P a disparu, et l'on a :

$$d[I]/dt = -k_2 \cdot [I]^2$$

$$1/[I] = k_2 \cdot t + 1/[I]_0$$

On peut écrire :

$$[HAP] = [I]_0 - [I]$$

$$[HAP] = [I]_0 \cdot [I] \cdot k_2 \cdot t$$

$$1/[I] = k_2 \cdot t + 1/[I]_0 = \cdot [I]_0 \cdot k_2 \cdot t / [HAP]$$

D'où :

$$1/[HAP] = 1/[I]_0 + 1 / k_2 \cdot t \cdot [I]_0^2$$

La courbe $1/[HAP] = f(1/t)$ est donc une droite de pente $1/k_2[I]_0^2$. Il s'agit là aussi de la concentration en HAP formé par voie endogène, donc en toute rigueur il convient de soustraire à la concentration en HAP au temps t la concentration au temps zéro afin de ne pas tenir compte de la contamination par voie exogène.

○ Hypothèse H4 : réaction 1 et réaction 2 limitantes avec des cinétiques d'ordre 1

Dans ce cas la réaction 1 est également limitante dans la formation de l'hydrocarbure, et sa constante de vitesse doit être prise en compte :

$$d[P]/dt = -k_1 \cdot [P] \quad \text{ce qui donne } [P] = [P]_0 \cdot \exp(-k_1 t)$$

$$d[I]/dt = k_1 \cdot [P] - k_2 \cdot [I] \quad \text{ou encore } d[I]/d[P] = -1 + k_2 \cdot [I] / k_1 \cdot [P]$$

Par intégration on obtient donc la concentration de l'intermédiaire eu temps t :

$$[I] = [P]_0 \cdot [\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)] \cdot k_1 / k_1 - k_2$$

On peut donc en déduire la concentration du HAP formé :

$$[HAP] = [P]_0 - [I] - [P]$$

$$[HAP] = [P]_0 \cdot \{k_2 \cdot [1 - \exp(-k_1 t)] - k_1 \cdot [1 - \exp(-k_2 t)]\} / (k_2 - k_1)$$

Comme précédemment la concentration en HAP dans cette relation est la fraction néoformée.

○ Hypothèse H5 : réaction 1 limitante avec une cinétique d'ordre 1 (réaction 2 rapide)

Dans ce cas la réaction 1 est l'étape limitante, donc l'intermédiaire se forme lentement, et il est ensuite vite consommé ; sa concentration dans le milieu est faible. On peut donc considérer sa concentration quasi-nulle à chaque instant.

On a toujours :

$$[P] = [P]_0 \cdot \exp(-k_1 t)$$

Cette fois on peut écrire :

$$[HAP] = [P]_0 - [P]$$

D'où :

$$[HAP] = [P]_0 (1 - \exp(-k_1 t))$$

Les courbes théoriques donnant l'allure des concentrations de P, I et HAP en fonction du temps pour chacune de ces hypothèses sont schématisées sur la **Figure 4.2**.

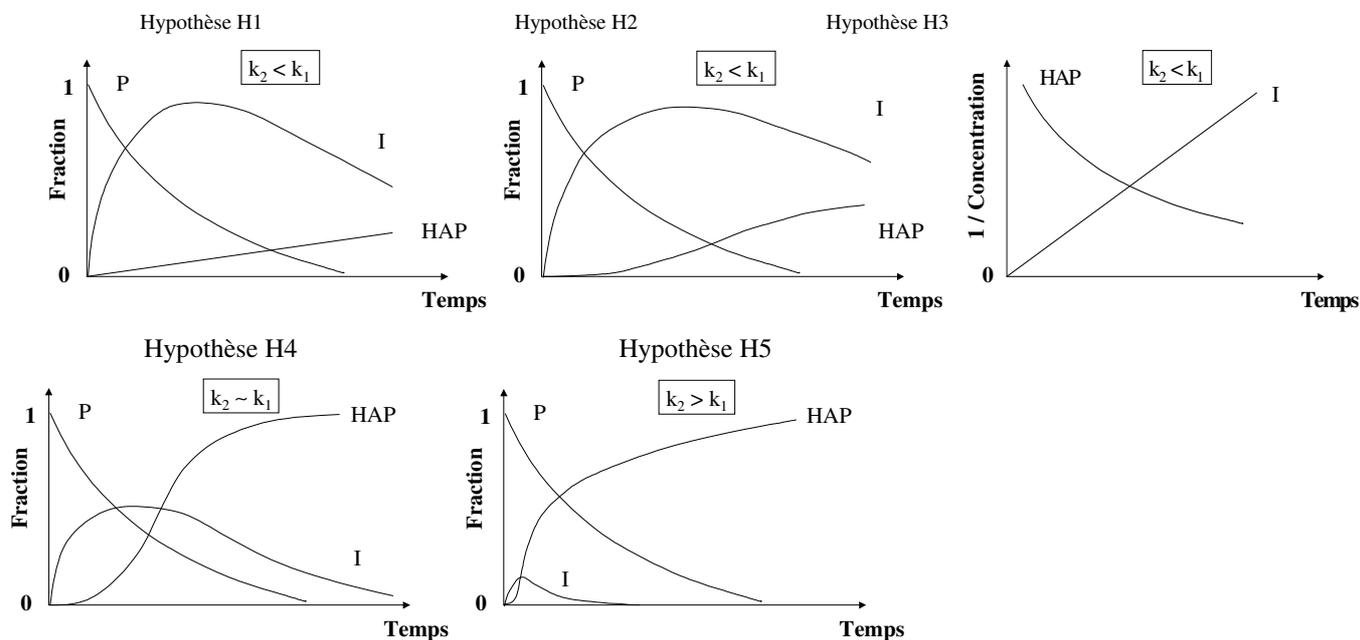


Figure 4.2: Schématisation de l'allure des concentrations en fonction du temps pour chacun des hypothèses considérées pour le modèle simplifié.

Comme la seule donnée que nous ayons est la concentration des HAP en fonction du temps, il est illusoire de prétendre déterminer précisément l'ordre des réactions et les mécanismes de formation, et ce d'autant que les mesures effectuées sont peu précises. Cependant nous pouvons discuter la tendance générale des courbes obtenues.

4.2.1.2.2 Interprétation des résultats expérimentaux

Nous avons tracé les courbes donnant les concentrations estimées en HAP en fonction de la durée de torréfaction (voir **Figures 4.3 à 4.5**). On obtient deux types de comportement cinétique : soit une relation $[HAP] = f(t)$ linéaire, soit une relation exponentielle. Dans certains cas le manque de précision des analyses, lié aux faibles concentrations estimées, ne permet pas une corrélation satisfaisante, mais on observe toutefois une tendance (c'est particulièrement le cas pour l'anthracène et le benzo[k]fluoranthène).

Concernant les autres HAP recherchés (i.e. fluorène, benzo[b]fluoranthène, benzo[a]pyrène et dibenzo[ah]anthracène), leur présence à l'état de traces dans les échantillons de café n'a pas permis de mettre en évidence leur formation au cours de la torréfaction. Ceci est intéressant, puisque la majorité de ces composés sont très toxiques, et qu'ils contribuent donc fortement à l'équivalent toxique du mélange des HAP. Il semblerait même qu'une dégradation de certains

HAP soit possible, notamment pour le fluorène puisque ce composé n'est présent que dans le café vert avec une concentration de $0.31 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Même si ces résultats sont approximatifs compte tenu d'interférents gênant la quantification de ce composé, ils sont cohérents ; en effet on peut penser que cet HAP à 2 cycles pourrait éventuellement contribuer à la formation des autres HAP au cours de la torréfaction.

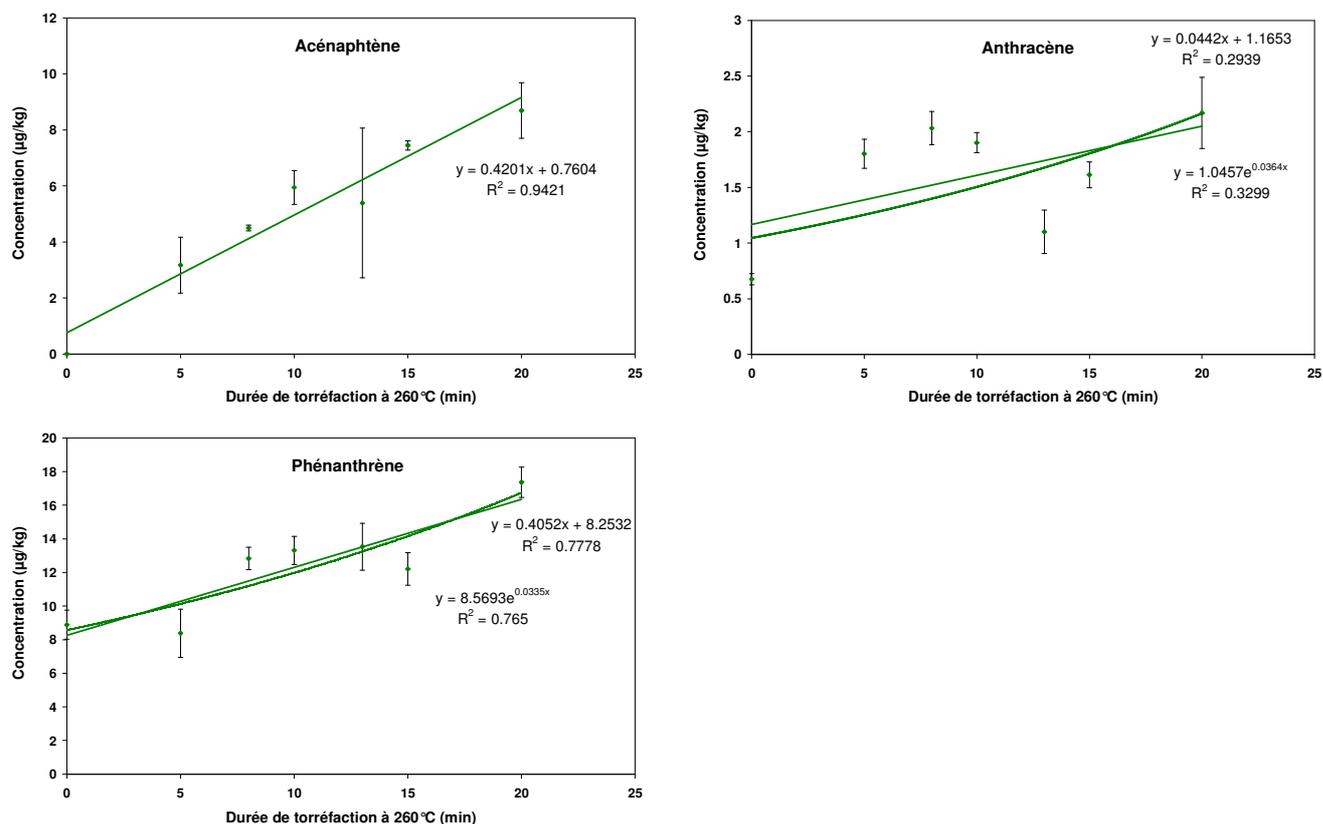


Figure 4.3 : Corrélations entre les concentrations estimées pour les HAP à 3 cycles détectés dans les échantillons de café et la durée de torréfaction (pour une température de l'air entrant de 260°C).

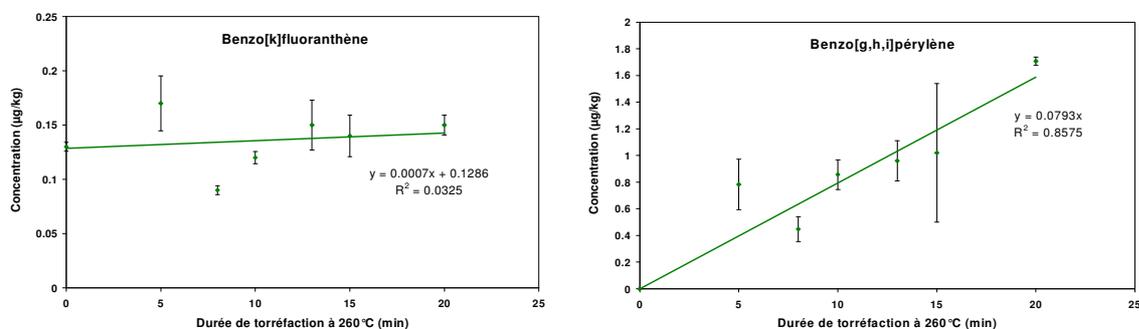


Figure 4.4 : Corrélations entre les concentrations estimées pour les HAP à 5 et 6 cycles détectés dans les échantillons de café et la durée de torréfaction (pour une température de l'air entrant de 260°C)

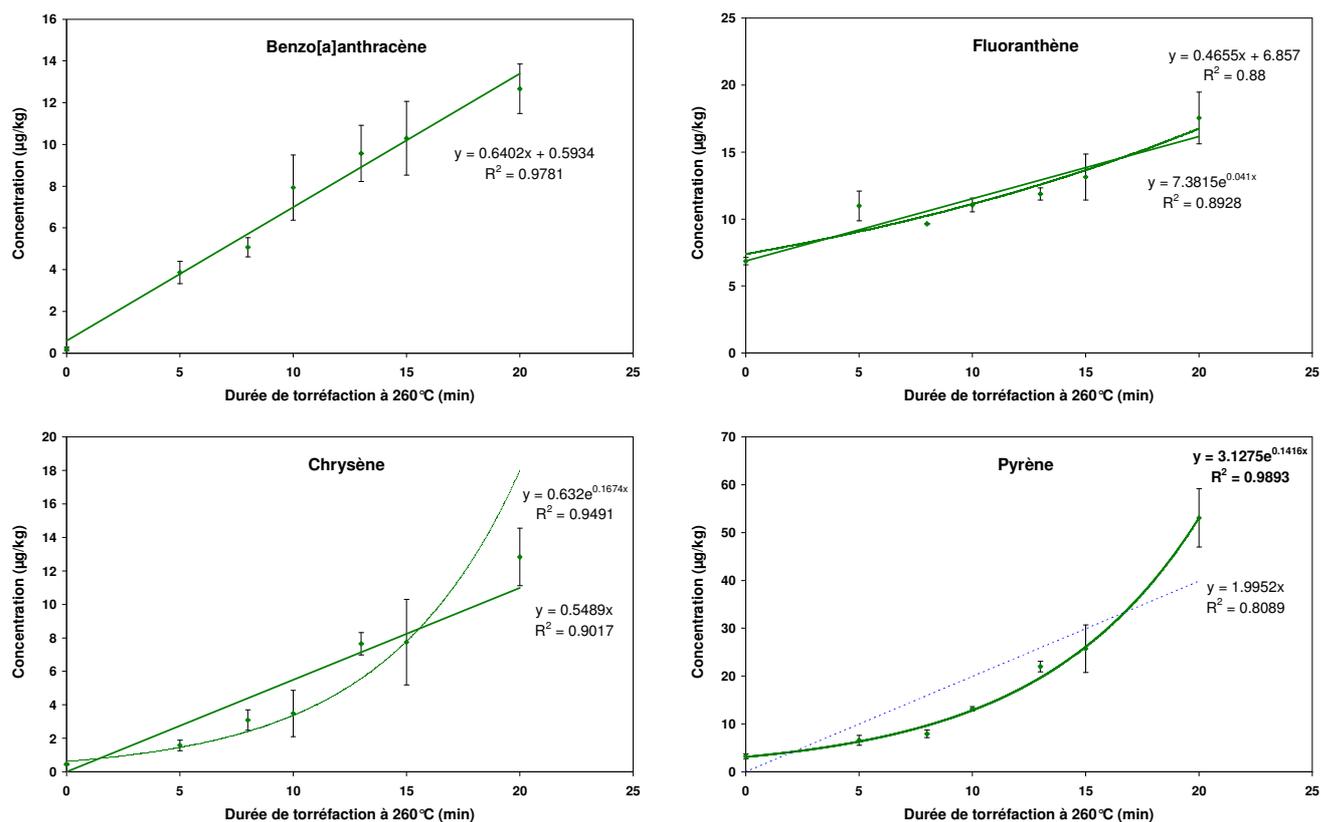


Figure 4.5 : Corrélations entre les concentrations estimées pour les HAP à 4 cycles détectés dans les échantillons de café et la durée de torréfaction (pour une température de l'air entrant de 260°C).

Nous avons testé plusieurs hypothèses pour interpréter nos résultats.

○ Validité de l'hypothèse H1

Lorsqu'une relation linéaire peut être envisagée pour $[\text{HAP}] = f(t)$, on peut considérer l'hypothèse H1 comme valide, et la pente de la droite de corrélation permet donc d'estimer la constante de vitesse k_2 . On observe ce type de comportement pour l'acénaphthène, le benzo[a]anthracène, et le benzo[ghi]pérylène. Dans le cas du benzo[k]fluoranthène, la corrélation est très mauvaise en raison de la grande dispersion des résultats, et la pente de la droite proche de zéro indique que la concentration ne varie pas de manière significative durant la torréfaction. Quant à l'anthracène, au phénanthrène, au fluoranthène, et au chrysène on peut également proposer ce type de cinétique, même si une corrélation de type exponentielle est également possible.

Le cas du pyrène est particulier puisque, pour ce composé, seule une corrélation de type exponentiel est pertinente avec les concentrations estimées. Toutefois pour le chrysène et le pyrène on peut considérer que la cinétique est d'ordre 0 en début de formation (0-10 min) (voir **Figure 4.6**). Ce type de comportement cinétique a déjà été observé durant la formation

des aldéhydes de Strecker, pour lesquels un intermédiaire doit être auparavant formé par la réaction de Maillard [Creimer et Eichner (2000)] ; l'ordre apparent est zéro tant que la concentration de l'intermédiaire formé est stationnaire.

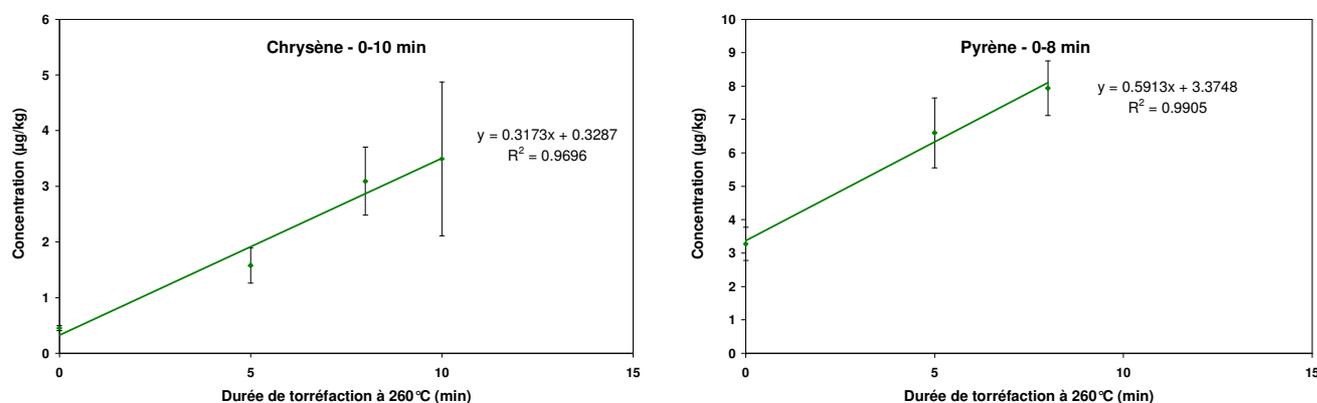


Figure 4.6 : Approximation d'une cinétique d'ordre 0 pour la réaction 2 sur la période 0-10 min pour le chrysène, et 0-8 min pour le pyrène.

En considérant un ordre 0 pour la plupart des composés, nous obtenons une estimation des constantes de vitesse comme indiqué dans le **Tableau 4.2** (le benzo[k]fluoranthène n'est pas indiqué puisque sa formation n'est pas significative).

Pour l'acénaphthène et le benzo[a]anthracène les constantes de vitesse sont déterminées avec une corrélation satisfaisante. Les résultats sont moins satisfaisants pour le benzo[ghi]pérylène en raison des faibles concentrations en ce composé. La constante de vitesse estimée est très faible pour le benzo[ghi]pérylène, ce qui est cohérent avec les faibles concentrations trouvées dans le café torréfié. A l'inverse la constante de formation du benzo[a]anthracène est élevée ($0.640 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), ce qui est préoccupant en raison de la toxicité de cet HAP ; la forme angulaire de ce composé pourrait expliquer sa formation rapide par l'accolement d'un noyau aromatique.

Tableau 4.2 : Les constantes de vitesse estimées en supposant un ordre 0 pour la réaction de formation des HAP analysés dans les échantillons de café torréfié à 260°C.

Composés	Nombre de cycles	Ordre de la réaction 2	k_2 ($\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Coefficient de corrélation (r^2)
Acénaphthène	3	0	0.420	0.942
Anthracène	3	0	0.044	0.294
Phénanthrène	3	0	0.405	0.778
Benzo[a]anthracène	4	0	0.640	0.978
Fluoranthène	4	0	0.465	0.880
Chrysène	4	0 (0-20 min)	0.549	0.902
Chrysène	4	0 (0-10 min)	0.317	0.970
Pyrène	4	0 (0-8 min)	0.591	0.991
Benzo[ghi]pérylène	6	0	0.079	0.857

Pour l'anthracène, la forte dispersion des résultats rend la corrélation non pertinente ; ceci est lié aux très faibles concentrations observées dans le café. Pour le phénanthrène et le fluoranthène, les corrélations sont meilleures, bien qu'insuffisantes. Leurs constantes de vitesse estimées sont similaires à celle de l'acénaphène : 0.405, 0.465 et 0.420 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ respectivement, bien que leurs structures soient différentes (notamment cycle à 5 carbones pour le fluoranthène). Quant au pyrène, sa formation au début de la torréfaction est quasiment deux fois plus rapide que celle du chrysène (0.591 et 0.317 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ respectivement) ; ceci pourrait s'expliquer par la forme plus condensée du pyrène.

○ Validité des hypothèses H2 ou H5

En se basant uniquement sur la formation du produit, aucune relation simple reliant [HAP] au temps ne peut être testée. Il conviendrait en toute rigueur de faire des simulations avec plusieurs valeurs possibles de la constante de vitesse. Nous avons fait quelques essais comme illustré sur la **Figure 4.7** pour le benzo[a]anthracène et le chrysène.

Il apparaît donc que pour les HAP dont la courbe [HAP] = f (t) est linéaire (ex : le benzo[a]anthracène), on peut également envisager l'une de ces 2 hypothèses comme valide, avec une constante de vitesse très faible (justifiant ainsi l'allure linéaire de la courbe dans l'intervalle de temps considéré). En revanche pour le chrysène et le pyrène, dont la courbe est de type exponentiel, cette hypothèse n'est pas valide, donc pour ces 2 composés l'ordre de la réaction limitante n'est pas de 1.

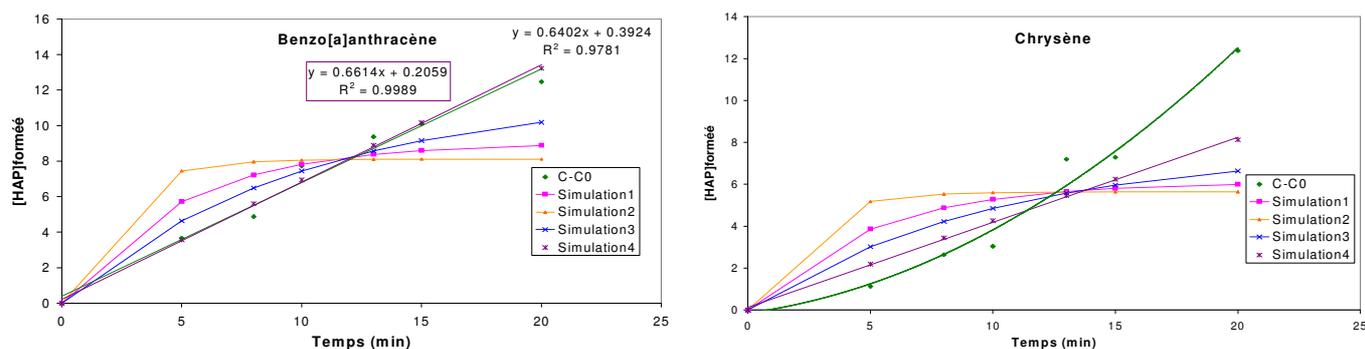


Figure 4.7 : Comparaison de données simulées avec les résultats expérimentaux pour le benzo[a]anthracène et le chrysène(à 260°C). Simulation 1 : $k = 0.2 \text{ min}^{-1}$; Simulation 2 : $k = 0.5 \text{ min}^{-1}$; Simulation 3 : $k = 0.1 \text{ min}^{-1}$; Simulation 4 : $k = 0.01 \text{ min}^{-1}$;

○ Validité de l'hypothèse H3

Si l'hypothèse H3 est valide, alors la relation $1/[\text{HAP}] = f(1/t)$ est une droite (à condition de considérer la concentration effectivement formée par voie endogène, et donc de soustraire la

concentration en HAP au temps zéro) ; en outre cette droite doit avoir une pente positive (i.e. $1/k_2[I]_0^2$) et une ordonnée à l'origine positive également (i.e. $1/[I]_0$).

Nous avons tracé les corrélations correspondantes pour les différents HAP comme présenté dans l'**annexe 9**. Nous obtenons une corrélation linéaire uniquement pour 4 composés : acénaphthène, benzo[a]anthracène, chrysène et pyrène. Mais seuls les 2 premiers composés possèdent une ordonnée à l'origine positive comme indiqué dans le **Tableau 4.3**.

Tableau 4.3 : Les constantes de vitesse estimées en supposant un ordre 2 pour la réaction de formation des HAP analysés dans les échantillons de café torréfié à 260°C.

Composés	Nombre de cycles	Ordre de la réaction 2	$1/[I]_0$ ($\mu\text{g}^{-1}\text{kg}$)	$1/k_2 [I]_0^2$ ($\mu\text{g}^{-1}\text{kg}\cdot\text{min}^{-1}$)	k_2 ($\mu\text{g}^{-1}\text{kg}\cdot\text{min}^{-1}$)	Coefficient de corrélation (r^2)
Acénaphthène	3	2	+ 0.0567	+ 1.293	0.00248	0.950
Benzo[a]anthracène	4	2	+ 0.0095	+ 1.352	0.000067	0.963
Chrysène	4	---	- 0.238	+ 5.468	---	0.978
Pyrène	4	---	- 0.084	+ 2.001	---	0.950

L'allure des courbes $1/[HAP] = f(t)$ pour l'acénaphthène et le benzo[a]anthracène est donnée sur la **Figure 4.8**.

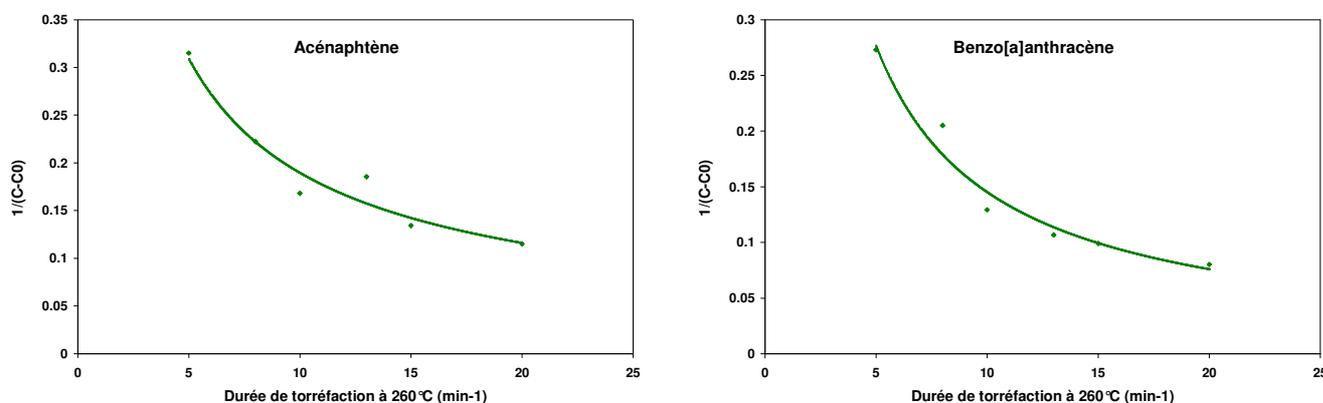


Figure 4.8 : Approximation d'une cinétique d'ordre 2 pour la réaction 2 dans le cas de l'acénaphthène et du benzo[a]anthracène.

Par conséquent en supposant l'hypothèse H3 valide pour l'acénaphthène et le benzo[a]anthracène, on peut estimer la constante de vitesse k_2 d'après la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite $1/[HAP] = f(1/t)$. On trouve $k_2 = 0.00248 \mu\text{g}^{-1}\cdot\text{kg}\cdot\text{min}^{-1}$ pour l'acénaphthène, et $k_2 = 0.000067 \mu\text{g}^{-1}\cdot\text{kg}\cdot\text{min}^{-1}$ pour le benzo[a]anthracène. Il s'agit de valeurs très faibles, non réalistes pour qu'il y ait effectivement formation de ces composés dans le temps considéré ici. Nous avons donc rejeté l'hypothèse H3.

○ Validité de l'hypothèse H4

Nous avons fait quelques simulations en choisissant des valeurs ciblées pour les deux constantes de vitesse, basées sur les valeurs que nous avons estimées lors du test de validité de l'hypothèse H1. Seuls le benzo[a]anthracène et le chrysène ont été étudiés, afin de comparer au test de validité de H2 ou H5 ; les simulations sont données dans l'**annexe 9**. Nous obtenons une adéquation satisfaisante avec les valeurs expérimentales dans quelques cas particuliers, présentés sur la **Figure 4.9**.

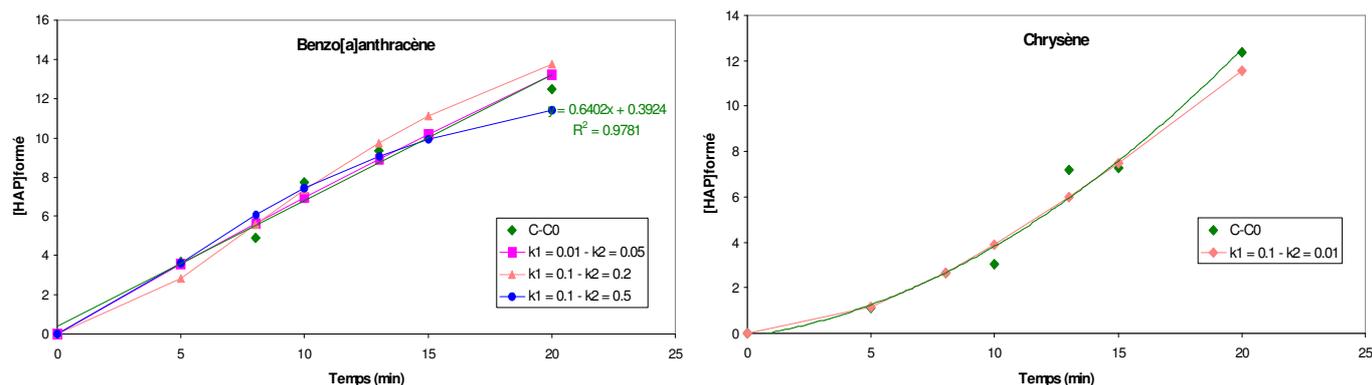


Figure 4.9 : Comparaison des simulations avec les résultats expérimentaux pour le benzo[a]anthracène et le chrysène (les valeurs des k sont données en min^{-1}).

Pour le benzo[a]anthracène, plusieurs couples de $k_1 - k_2$ sont possibles : (1) $k_1 = 0.01$ et $k_2 = 0.05 \text{ min}^{-1}$ (ou l'inverse); (2) $k_1 = 0.1$ et $k_2 = 0.2 \text{ min}^{-1}$ (ou l'inverse); (3) $k_1 = 0.1$ et $k_2 = 0.5 \text{ min}^{-1}$ (ou l'inverse). La première combinaison des constantes de vitesse semble donner la meilleure corrélation des trois. Pour le chrysène la seule simulation acceptable est avec $k_1 = 0.1$ et $k_2 = 0.01 \text{ min}^{-1}$ (ou l'inverse). Par suite, on peut également considérer que cette hypothèse H3 est valide pour la formation des HAP, sous réserve de l'ajustement des constantes de vitesse.

4.2.1.3 Conclusion

Il apparait que certains HAP se forment durant la torréfaction, avec dans le cas du pyrène une croissance exponentielle avec la durée. Toutefois ces résultats ont été observés pour une température assez élevée (260°C) de l'air entrant dans le torréfacteur, et ils sont insuffisants pour déterminer la cinétique de formation de ces composés. Il convient donc d'étudier l'effet de la température sur cette formation des HAP, afin de choisir ensuite les conditions de torréfaction permettant de minimiser la présence des HAP tout en assurant une qualité du café satisfaisante.

4.2.2 Influence de la température de torréfaction à durée constante

Dans cette partie nous avons procédé à une torréfaction de café vert à différentes températures de l'air entrant dans le torréfacteur (180, 200, 220, 240, 250 et 260°C), tout en maintenant la durée de torréfaction constante (5 ou 20 min) afin de suivre l'impact de la température sur la concentration de chaque HAP dans les différents échantillons. Nous avons torréfié deux cafés verts Arabica provenant de Cuba, l'un fourni par l'ENSIA, l'autre par l'INA-PG. Ce choix a été fait afin de prendre en compte la diversité possible des cafés verts pour une même origine, et notamment en terme de contamination exogène en HAP. En contrepartie cela nécessite de bien distinguer à chaque fois quel est le café vert qui a été torréfié, de manière à appréhender la formation effective des divers HAP durant la torréfaction.

4.2.2.1 Torréfaction à diverses températures pendant 5 min

Les concentrations estimées en HAP pour les différents échantillons torréfiés pendant 5 min à diverses températures sont données dans les **Tableaux 4.3 et 4.4**.

On peut tout d'abord discuter le comportement de chaque HAP, en excluant les composés pour lesquels les concentrations sont indétectables ou proches de la limite de détection (c'est-à-dire le fluorène, le benzo[*k*]fluoranthène et le benzo[*a*]pyrène). On constate que 5 min de torréfaction ne permettent pas de mettre en évidence un effet systématique de la température sur les concentrations estimées. On observe cependant quelques élévations de concentrations, notamment pour le phénanthrène à 250°C, et l'acénaphène à 240 et 250°C, même si ces expériences mériteraient certainement d'être réitérées pour confirmer ces observations. Il est possible que ces composés se forment préférentiellement à certaines températures, avant d'être ensuite dégradés pour former des HAP à nombre de cycles plus élevé. En outre on note globalement des concentrations sensiblement plus élevées pour le café torréfié à 260°C (particulièrement pour l'anthracène et le benzo[*a*]anthracène). Ainsi on détecte la présence de dibenzo[*ah*]anthracène et benzo[*ghi*]pérylène à cette température, même si les concentrations estimées restent faibles (respectivement 0.37 et 0.78 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Tableau 4.4 : Influence de la température de l'air entrant dans le torréfacteur sur les teneurs en HAP du café ENSIA (torréfaction pendant 5 min).

nd : non détecté (valeurs inférieures aux LOD estimées); * 1 seul essai pour cette expérience.

	Température de l'air entrant dans le torréfacteur										
	Café vert ENSIA		180°C		200°C		220°C		240°C*		260°C
	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)
Ace*	nd	-----	6.25	9.22	2.13	7.33	3.11	3.65	13.12	3.17	31.41
Fluorene*	traces	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----	0.35	nd	-----
Phen	8.89	9.72	7.36	8.51	6.05	1.99	6.51	14.08	9.26	8.39	17.14
Anthr	0.68	7.49	0.81	9.95	0.68	9.65	0.74	18.05	1.19	1.80	7.21
F	6.85	3.90	4.71	3.30	6.86	11.95	7.50	18.22	7.27	10.98	10.08
Pyr	3.27	15.14	3.45	2.49	3.57	5.57	3.63	14.91	4.43	6.60	15.83
B[a]A	0.20	41.52	0.17	13.71	0.75	26.33	nd	24.45	1.33	3.86	13.80
Chrys	0.45	9.75	0.69	16.93	1.85	2.46	1.73	24.38	1.85	1.58	20.0
B[b]F	0.27	13.36	0.20	10.45	traces	-----	0.18	47.06	nd	0.43	21.03
B[k]F	traces	-----	Traces	-----	nd	-----	nd	-----	traces	0.17	14.85
B[a]P	traces	-----	traces	-----	traces	-----	traces	-----	Traces	0.20	31.63
DB[ah]A	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	0.37	31.65
B[ghi]P	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	0.78	24.13
Σ 13 HAP	21.17		24.16		21.95		23.54		39.04	38.33	
Σ 11 HAP	20.86		17.62		19.77		20.43		25.58	35.16	
Σ HAP toxiq	8.70		6.81		10.15		10.29		11.89	20.17	
Σ HAP carcin	1.17		1.30		2.61		2.05		3.44	7.39	
TEQ (13 HAP)	0.26		0.24		0.17		0.14		0.40	1.17	
TEQ (11 HAP)	0.26		0.23		0.17		0.14		0.38	1.17	

Tableau 4.5 : Influence de la température de l'air entrant dans le torréfacteur sur les teneurs en HAP du café INA-PG (torréfaction pendant 5 min).

nd : non détecté (valeurs inférieures aux LOD estimées).

	Température de l'air entrant dans le torréfacteur					
	Café vert INA-PG		240°C		250°C	
	Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD (%)
Ace*	1.78	21.64	14.37	5.53	17.50	10.72
Fluorene*	0.64	3.96	traces	-----	nd	-----
Phen	4.60	7.59	4.71	10.84	11.02	16.53
Anthr	0.45	13.86	0.56	4.28	0.89	15.57
F	6.91	8.98	3.12	11.13	4.61	16.15
Pyr	2.63	5.91	1.28	3.15	1.83	25.18
B[a]A	traces	-----	0.40	16.67	1.06	5.89
Chrys	0.43	16.91	0.33	27.35	0.63	34.03
B[b]F	0.20	28.30	0.20	64.91	0.20	101.73
B[k]F	traces	-----	traces	-----	traces	-----
B[a]P	traces	-----	traces	-----	nd	-----
DB[ah]A	nd	-----	nd	-----	nd	-----
B[ghi]P	nd	-----	nd	-----	nd	-----
Σ 13 HAP	18.03		25.31		37.84	
Σ 11 HAP	15.62		10.73		20.33	
Σ HAP toxiq	8.39		4.74		7.49	
Σ HAP carcin	1.03		1.06		1.98	
TEQ (13 HAP)	0.25		0.13		0.21	
TEQ (11 HAP)	0.25		0.11		0.20	

Nous avons établi les proportions des HAP selon leur nombre de cycles, comme représenté sur la **Figure 4.10**.

On constate que la quasi-totalité des HAP analysés est constituée de composés à 3 et 4 cycles. Pour les deux cafés verts, on a une répartition similaire, avec sensiblement plus de composés à 4 cycles (50.9 et 56.0% pour les cafés ENSIA et INA-PG respectivement). Concernant l'influence de la température sur les proportions respectives de ces HAP, il est difficile de conclure. En effet, si pour le café INA-PG on observe une augmentation de la proportion en HAP à 3 cycles (liée à une élévation des concentrations observées en acénaphène et phénanthrène), pour le café ENSIA il n'y a pas de tendance nette. Il semble cependant qu'à 260°C on forme des HAP à 5 et 6 cycles comme précédemment souligné.

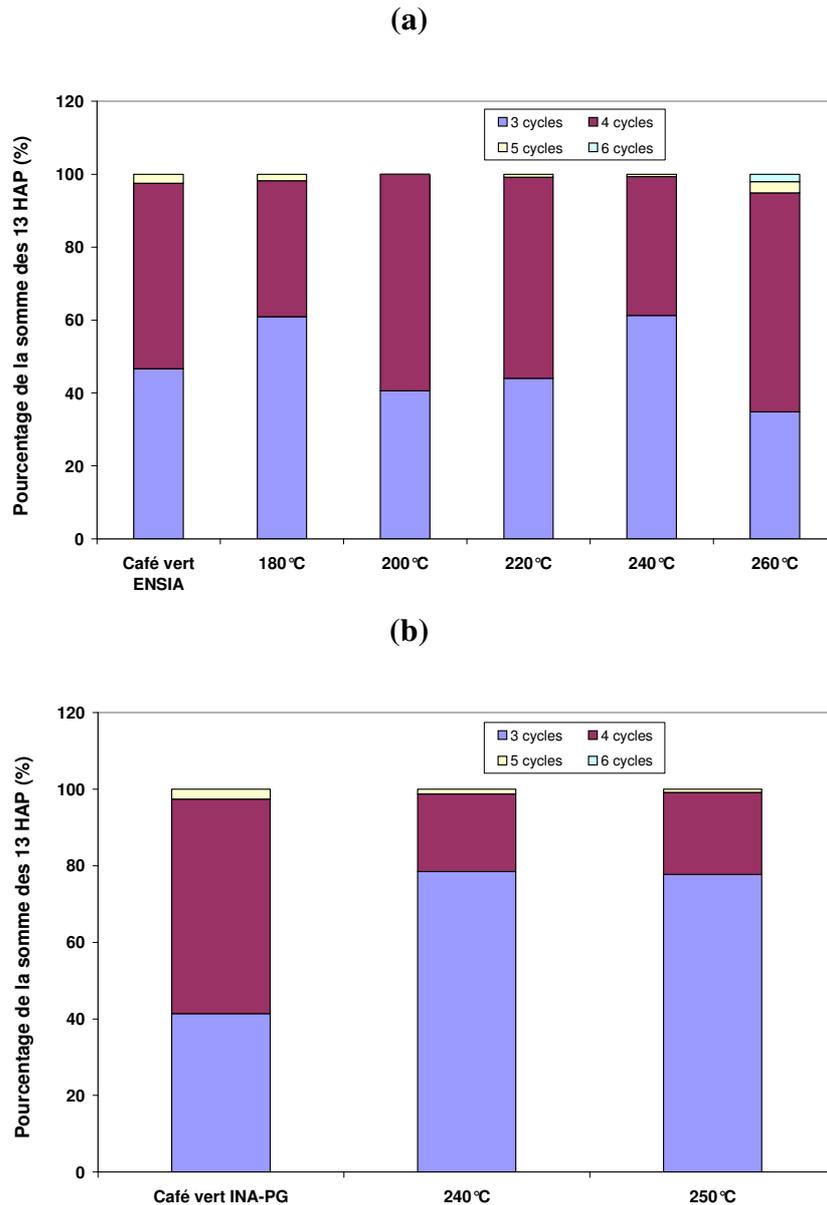


Figure 4.10 : Répartition des HAP selon leur nombre de cycles pour une torréfaction de 5 min à diverses températures de l'air entrant, et comparaison avec la composition du café vert. (a) torréfaction du café vert ENSIA, (b) torréfaction du café vert INA-PG.

Si l'on se réfère à la somme des HAP, on observe que sa concentration est multipliée par 2 entre les cafés verts (21.2 et 18.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les cafés ENSIA et IN-PG respectivement) et les cafés torréfiés entre 240 et 260°C (37.8-39.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Toutefois si l'on prend en compte uniquement les HAP toxiques, on observe une élévation significative de la concentration uniquement à 260°C (20.17 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), avec bien entendu parallèlement une augmentation de l'équivalent toxique (1.17 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ à 260°C). Ceci est en grande partie dû à la présence observée à cette température des HAP à 5 et 6 cycles.

Afin de mieux appréhender l'influence possible de la température, nous avons réalisé les mêmes expériences avec une durée de torréfaction plus importante.

4.2.2.2 Torréfaction à diverses températures pendant 20 min

Dans les mêmes conditions nous avons torréfié les deux cafés verts aux mêmes températures pendant cette fois 20 min. Les concentrations estimées en HAP aux diverses températures sont données dans les **Tableaux 4.5 et 4.6**.

Les concentrations observées à 240-250°C sont en accord avec celles reportées par Maier (1991) dans le café faiblement à moyennement torréfié : 1.7-5.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'anthracène, 0.6-13.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le fluoranthène, 4.0-5.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le benzo[a]anthracène, 5.6-12.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour le pyrène.

Afin de mieux visualiser le comportement des HAP en fonction de la température, et de comparer ces résultats avec ceux obtenus après seulement 5 min de torréfaction, nous avons représenté les résultats sous forme graphique (voir **Figure 4.11**). Seuls sont représentés les composés pour lesquels on obtient une modification notable des concentrations, avec des valeurs au-delà des limites de détection.

Les tendances précédemment observées après 5 min de torréfaction sont plus importantes après 20 min de torréfaction. Ainsi pour l'anthracène et le benzo[a]anthracène on note une formation d'autant plus prononcée que la température de torréfaction est élevée, avec une relation exponentielle. Ces deux composés se forment à partir de 220°C. En ce qui concerne le pyrène et le chrysène, leur formation n'est observée qu'à partir de 260°C. Il en va de même pour le benzo[ghi]pérylène, même si la concentration estimée à 260°C reste faible (1.71 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Par ailleurs nos résultats semblent montrer une formation de l'acénaphthène et du phénanthrène vers 240-250°C, puis ces composés semblent se dégrader par la suite à 260°C, probablement pour former des HAP à nombre de cycles plus élevé.

Tableau 4.6 : Influence de la température de l'air entrant dans le torréfacteur sur les teneurs en HAP du café INA-PG (torréfaction pendant 20 min).

nd : non détecté (valeurs inférieures aux LOD estimées). ; * 1 seul essai pour cette expérience.

	Température de l'air entrant dans le torréfacteur										
	Café vert ENSIA		180°C		200°C		220°C		250°C*		260°C
	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)
Ace*	nd	-----	5.75	5.17	7.12	1.36	4.87	11.53	10.99	8.69	11.42
Fluorene*	traces	-----	0.45	1.29	nd	-----	nd	-----	nd	nd	-----
Phen	8.89	9.72	13.27	9.01	7.45	5.69	14.60	2.92	46.87	17.37	5.26
Anthr	0.68	7.49	0.90	2.89	1.01	17.35	1.08	8.60	1.90	2.17	14.85
F	6.85	3.90	13.09	3.86	4.99	3.98	4.34	12.67	11.48	17.54	11.03
Pyr	3.27	15.14	6.07	10.27	3.47	19.59	2.60	15.22	5.87	53.05	11.47
B[a]A	0.20	41.52	0.16	11.43	0.54	32.17	1.40	18.69	6.52	12.67	9.42
Chrys	0.45	9.75	1.13	2.09	2.21	19.31	1.84	6.40	1.29	12.82	13.43
B[b]F	0.27	13.36	0.31	6.62	0.14	21.87	0.16	20.17	0.20	nd	-----
B[k]F	traces	-----	Traces	-----	nd	-----	traces	-----	traces	traces	-----
B[a]P	traces	-----	traces	-----	traces	-----	Traces	-----	nd	nd	-----
DB[ah]A	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	nd	-----
B[ghi]P	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	1.71	36.49
Σ 13 HAP	21.17		41.40		27.00		30.90		93.89	126.16	
Σ 11 HAP	20.86		35.20		19.88		26.03		71.52	117.47	
Σ HAP toxiq	8.70		15.86		8.96		8.84		36.58	47.05	
Σ HAP carcin	1.17		1.30		2.95		3.42		16.06	27.34	
TEQ (13 HAP)	0.26		0.34		0.22		0.25		1.91	1.63	
TEQ (11 HAP)	0.26		0.33		0.21		0.24		1.89	1.62	

Tableau 4.7 : Influence de la température de l'air entrant dans le torréfacteur sur les teneurs en HAP du café INA-PG (torréfaction pendant 20 min).

nd : non détecté (valeurs inférieures aux LOD estimées).

	Température de l'air entrant dans le torréfacteur					
	Café vert		240°C		250°C	
	INA-PG					
	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	RSD (%)
Ace*	1.78	21.64	36.44	18.31	11.47	9.99
Fluorene*	0.64	3.96	nd	-----	nd	-----
Phen	4.60	7.59	18.08	5.45	44.95	14.48
Anthr	0.45	13.86	1.91	3.18	1.95	4.57
F	6.91	8.98	4.69	2.07	11.50	11.64
Pyr	2.63	5.91	2.29	15.40	6.06	11.30
B[a]A	traces	-----	3.68	9.80	6.52	13.49
Chrys	0.43	16.91	1.47	13.38	1.54	30.35
B[b]F	0.20	28.30	0.20	20.23	0.29	7.19
B[k]F	traces	-----	traces	-----	traces	-----
B[a]P	traces	-----	0.20	0.09	0.21	6.10
DB[ah]A	nd	-----	nd	-----	nd	-----
B[ghi]P	nd	-----	nd	-----	nd	-----
Σ 13 HAP	18.03		69.06		84.64	
Σ 11 HAP	15.62		32.62		73.17	
Σ HAP toxiq	8.39		12.25		22.16	
Σ HAP carcin	1.03		5.65		8.71	
TEQ (13 HAP)	0.25		0.72		1.07	
TEQ (11 HAP)	0.25		0.68		1.06	

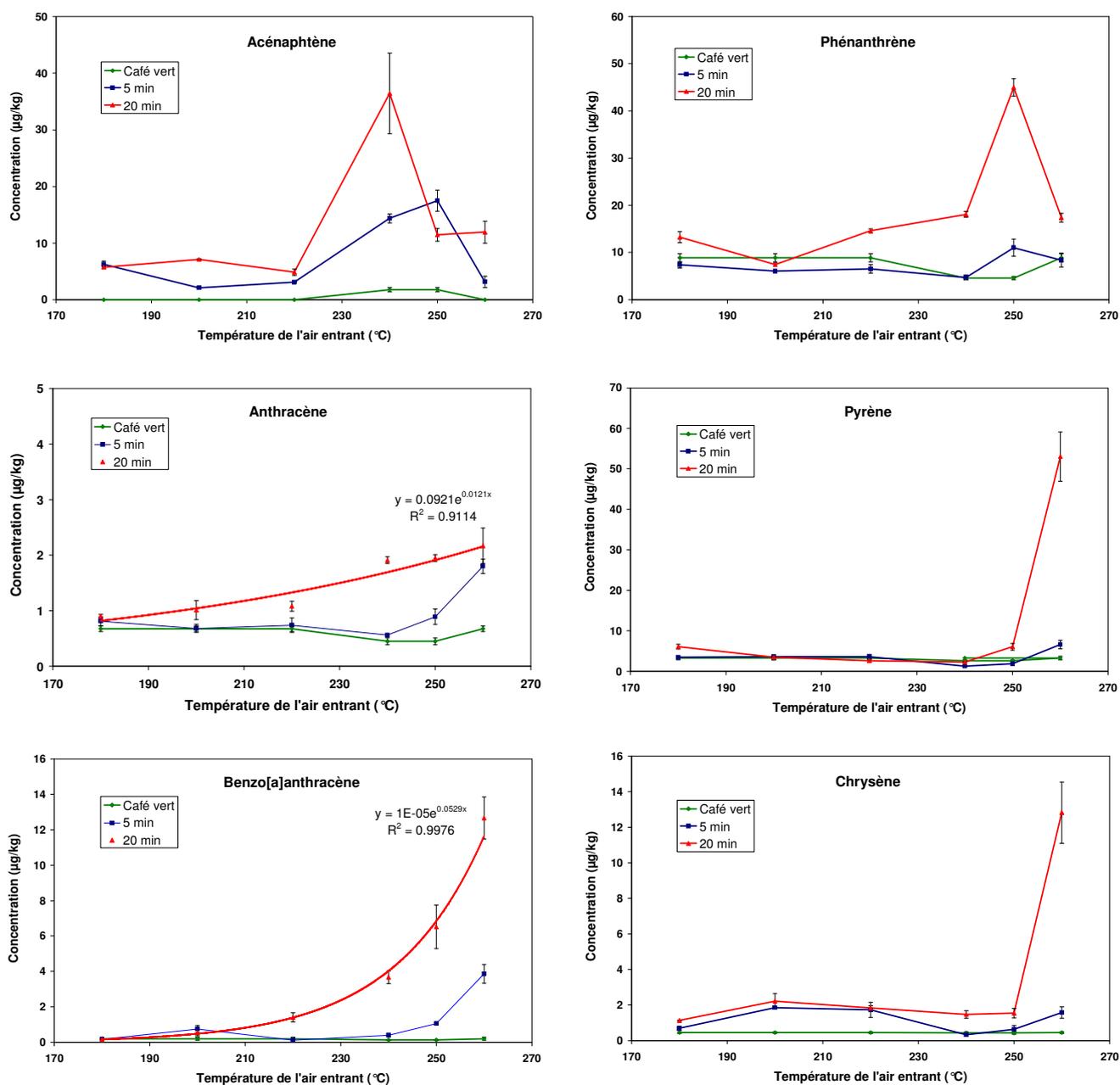


Figure 4.11 : Corrélations entre les concentrations estimées pour certains HAP détectés dans les échantillons de café et la température de l'air entrant (torréfaction à 5 et 20 min) ; les concentrations estimées pour les échantillons de café vert sont également indiquées sur les figures à titre de comparaison.

Les répartitions des HAP en fonction du nombre de cycles dans la molécule sont indiquées dans la **Figure 4.12**.

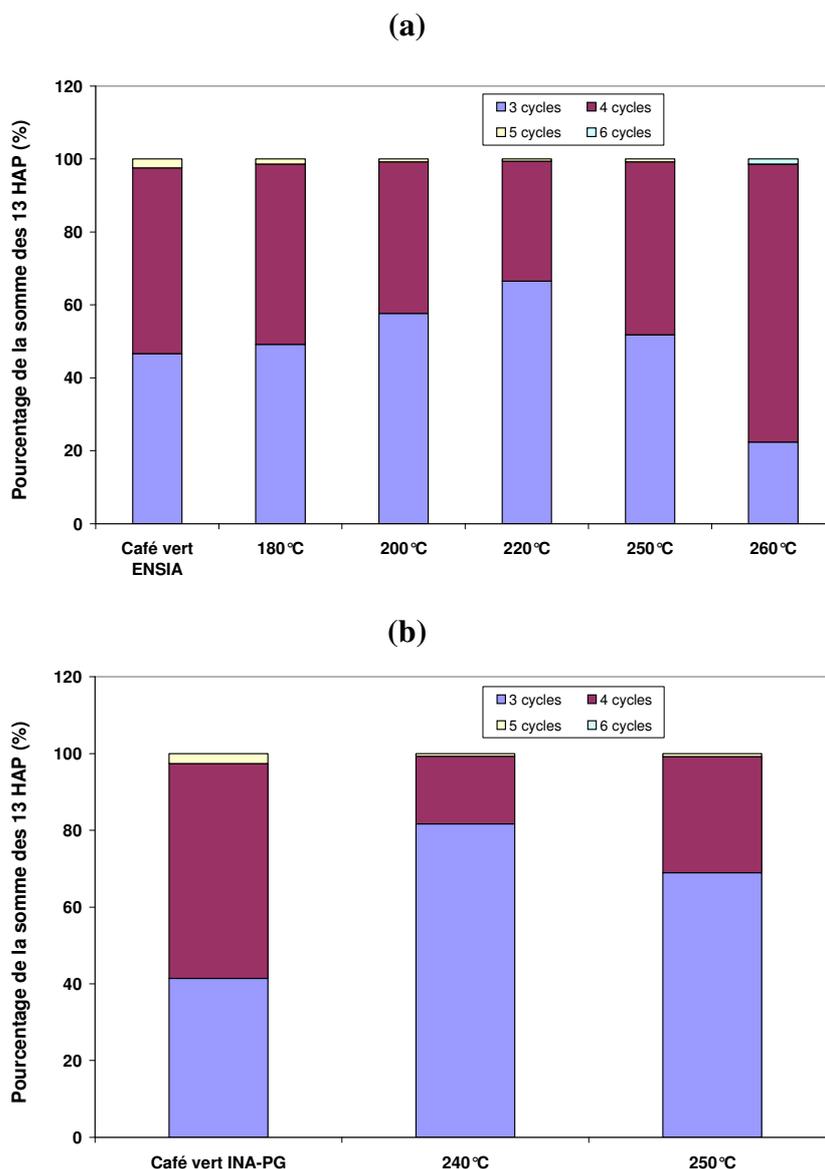


Figure 4.12 : Répartition des HAP selon leur nombre de cycles pour une torréfaction de 20 min à diverses températures de l'air entrant, et comparaison avec la composition du café vert. (a) torréfaction du café vert ENSIA, (b) torréfaction du café vert INA-PG.

Il semble que les proportions entre les HAP à 3 et 4 cycles soit sensiblement constantes jusqu'à 200°C, avec à partir de 240°C une proportion plus importante de composés à 3 cycles. Toutefois cette interprétation est à nuancer puisque pour le café ENSIA les proportions 3 cycles/4 cycles sont assez proches de celles observées pour le café vert. Il semble qu'à 260°C les HAP à 3 cycles se dégradent, pour donner des composés à 4 cycles et plus. Il conviendrait de réaliser des expériences complémentaires afin de confirmer ces résultats, et également de poursuivre l'étude en analysant les HAP à 5 et 6 cycles que nous n'avons pu détecter avec les conditions analytiques mise en œuvre (en particulier l'indéno[123-cd]pyrène).

Concernant la somme des HAP que nous avons analysés, on observe une nette augmentation à partir de 240°C, et la concentration totale augmente ensuite avec la température. Si l'on se réfère aux 11 HAP (i.e. exclusion de l'acénaphène et du fluorène pour lesquels l'analyse pose quelques problèmes d'interférences), la concentration totale est maximale à 260°C (117.47 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), principalement en raison de la formation de pyrène (53.05 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), benzo[*a*]anthracène (12.67 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), chrysène (12.82 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), et de fluoranthène (17.54 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Compte tenu de la toxicité de certains de ces composés, on note une évolution similaire de l'équivalent toxique du mélange. Et même si les composés les plus toxiques (en particulier le benzo[*a*]pyrène et le dibenzo[*ah*]anthracène), ne sont pas détectés dans les cafés torréfiés, ou alors seulement à l'état de traces, on note une augmentation importante de la somme des HAP carcinogènes avec la température.

Par la suite nous avons essayé d'appréhender l'effet de la température sur les cinétiques des réactions de formation des HAP.

4.2.2.3 Influence de la température sur les cinétiques des réactions

Les paramètres cinétiques tels que l'ordre de la réaction, la constante de vitesse et l'énergie d'activation sont essentiels pour prédire la formation des HAP au cours de la torréfaction. Ainsi l'étude cinétique menée à 260°C nous a permis de proposer l'ordre 0 pour les réactions de formation de plusieurs HAP et d'estimer les constantes de vitesse de formation à cette température. Les résultats aux autres températures ont donc été exploités de la même manière, afin d'évaluer les constantes de vitesse, dans le but ensuite d'étudier l'effet de la température sur les valeurs de ces constantes. Cette étude est très approximative, puisque nous avons seulement 3 points pour les températures intermédiaires, à savoir 0 (café vert), 5 et 20 min de torréfaction. Les résultats détaillés sont présentés dans l'**annexe 9**.

Nous avons essayé de corréliser ces variations de constantes de vitesse avec la loi d'Arrhénius, qui est la suivante :

$$k_2 = A.\exp(- E_a / RT) \quad (4)$$

avec A : constante d'Arrhenius (même unité que k), E_a : énergie (ou enthalpie libre) d'activation (J.mol^{-1}), R: constante des gaz parfaits ($8.3145 \text{ J. mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T: température (K).

Par linéarisation de l'équation (4), on obtient :

$$\text{Ln}k_2 = \text{Ln}A - E_a / RT \quad (5)$$

Par conséquent, si la loi d'Arrhénius est vérifiée, le tracé de $\text{Ln}k_2$ en fonction de $1/T$ doit donner une droite de pente $- E_a / R$, et d'ordonnée à l'origine $\text{Ln}A$. Nous avons donc tracé les courbes correspondantes comme indiqué dans l'**annexe 9**. Nous avons ainsi pu estimer

l'énergie d'activation de la réaction de formation, grâce à la pente de la droite obtenue. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 4.8**.

Tableau 4.8 : Estimation des énergies d'activation des réactions de formation des HAP analysés dans les échantillons de café torréfié.

Composés	Nombre de cycles	LnA	- Ea / R	Ea (kJ.mol ⁻¹)	R ²
Acénaphène	3	12.48	-6452	53.6	0.542
Anthracène	3	9.63	-6470	53.8	0.894
Phénanthrène	3	11.58	-5968	49.6	0.714
Benzo[a]anthracène	4	31.23	-16885	140.4	0.988
Fluoranthène	4	1.07	-1059	8.8	0.080
Chrysène	4	---	---	---	---

Même si les corrélations sont très approximatives, il est intéressant de constater que nous observons une énergie d'activation voisine de 50 kJ.mol⁻¹ pour les trois HAP à 3 cycles, alors que celle-ci est trois fois plus élevée pour le benzo[a]anthracène qui comporte 4 cycles. Ceci est en accord avec une autre étude qui reportait des énergies d'activation croissantes avec la taille de la molécule lors de la formation des HAP par pyrolyse [Sharma et Hajaligol (2003)]. Pour le chrysène la corrélation linéaire n'a pas pu être établie, vraisemblablement car sur l'intervalle de temps considéré (0-20 min) l'ordre apparent n'est pas égal à zéro ; ceci n'est pas surprenant compte tenu de nos observations précédentes à 260°C. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous n'avons pas considéré ici le pyrène.

Ces énergies d'activation sont assez modérées ; à titre de comparaison, les réactions de dégradation des phénols, tannins, protéines et sucres au cours de la torréfaction d'un substitut de café ont des énergies d'activation entre 18.1 et 28.4 kJ.mol⁻¹ [Medoua et Mbofung (2007)].

4.2.3 Modélisation avancée de la formation des HAP

Nous avons réalisé quelques expériences complémentaires afin de compléter les données nécessaires à la mise en œuvre d'un modèle cinétique. Deux types de modélisation ont été testés : (1) une modélisation basée sur la loi d'Arrhénius, (2) une modélisation à l'aide d'un réseau de neurones.

4.2.3.1 Modélisation basée sur la loi d'Arrhénius

Ce modèle part de l'hypothèse de base que les constantes de vitesse des réactions suivent la loi d'Arrhénius. Dans ce cas les réactions sont généralement d'ordre 1, avec en règle générale seulement deux réactifs :



La vitesse de réaction est donnée par :

$$-d[R_2]/dt = k.[R_1].[R_2] \quad \text{avec } k = k_0.\exp(-E_a/RT)$$

L'énergie d'activation est en général comprise entre 30 et 250 kJ K⁻¹mol⁻¹, et la constante de vitesse k entre 10³ et 10¹⁰ s⁻¹mol⁻¹.

4.2.3.1.1 *Modèle 1*

Dans ce modèle nous avons considéré les réactions consécutives suivantes :



avec I_p : produits inactifs, R₃ et P₁ : composés non présents dans les conditions initiales, R₂ et R₄ : réactifs supposés être en excès dans le système.

On obtient donc les vitesses de réactions suivantes :

$$\text{réaction 1 : } k_1.[R_1].[R_2].\exp(-E_{a1}/RT)$$

$$\text{réaction 2 : } k_2.[R_3].[R_4].\exp(-E_{a2}/RT)$$

Comme R₂ et R₄ sont supposés être excès, leurs concentrations sont indépendantes du temps ; en revanche [R₁] et [R₃] dépendent du temps. On a donc :

$$d[R_1]/dt = -k_0.\exp(-E_{a1}/RT).[R_1].[R_2]$$

$$d[R_3]/dt = k_0.\exp(-E_{a1}/RT).[R_1].[R_2] - k_0.\exp(-E_{a2}/RT).[R_3].[R_4]$$

On pose :

$$K_1 = k_{01}[R_2]$$

$$K_2 = k_{02}[R_4]$$

Ainsi on on peut écrire :

$$d[R_1]/dt = -K_1.\exp(-E_{a1}/RT).[R_1]$$

$$d[R_3]/dt = K_1.\exp(-E_{a1}/RT).[R_1] - K_2.\exp(-E_{a2}/RT).[R_3]$$

On obtient donc pour R₁ :

$$d[R_1]/[R_1] = -K_1.\exp(-E_{a1}/RT).dt$$

L'intégration donne :

$$\ln [R_1] - \ln [R_{1,t=0}] = -K_1.\exp(-E_{a1}/RT).t$$

$$[R_1] = [R_{1,t=0}].\exp(-K_1.\exp(-E_{a1}/RT).t)$$

Dans le cas de R₃ et P₁ on obtient :

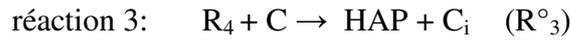
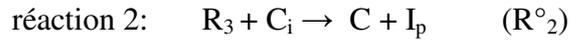
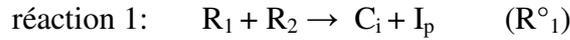
$$[R_3] = K_1[R_{1,t=0}]\exp(-E_{a1}/RT)[\exp(-K_1.\exp(-E_{a1}/RT)t) - \exp(-K_2.\exp(-E_{a2}/RT)t)] / [K_2.\exp(-E_{a2}/RT) - K_1.\exp(-E_{a1}/RT)]$$

$$[P_1] = [R_{1,t=0}] - [R_1] - [R_3]$$

Il s'avère en pratique que les contraintes sur k₁, k₂, E_{a1} et E_{a2} sont incompatibles avec les données expérimentales que nous avons obtenues. Par conséquent ce modèle n'est pas valide.

4.2.3.1.2 Modèle 2

Le décalage observé entre les données expérimentales et le modèle précédent, ainsi que la progression de type second ordre observée, nous a conduits à orienter le modèle vers un système complexe auto-catalysé du type :

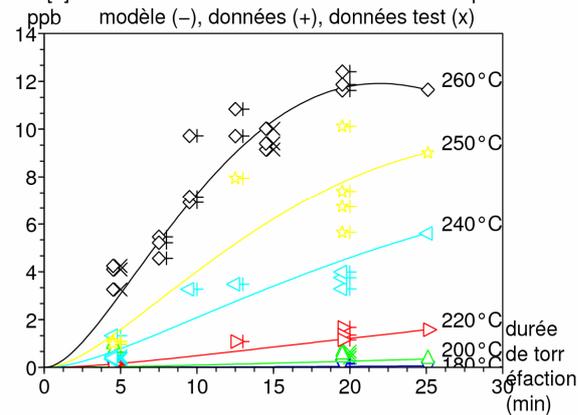


avec HAP : composé formé analysé, I_p : produits inactifs, C : catalyseur inconnu, C_i : forme inactive du catalyseur, R_1 , R_2 , R_3 , et R_5 : réactifs supposés être en excès dans le système.

La réaction 1 est la réaction d'initiation d'une production auto-catalytique de cet HAP ; les réactions 2 et 3 sont des réactions de propagation ; la réaction 4 est la réaction d'oxydation de cet HAP formé.

Les résultats expérimentaux pour le benzo[a]anthracène et le chrysène satisfont à ce modèle cinétique complexe comme l'illustre la **Figure 4.13**. Les valeurs utilisées pour l'ajustement du modèle (9 paramètres inconnus) sont indiquées dans le **Tableau 4.9**. Cet ajustement est non-linéaire. Toutefois, les valeurs obtenues ne peuvent pas être considérées comme des constantes de réaction clairement identifiées, vu le petit nombre de points en présence d'un bruit de mesure conséquent. Pour la même raison, le schéma réactionnel ici adopté ne reflète pas nécessairement le mécanisme réel.

benzo[a]anthracène dans le café torréfié selon la température :



chrysène dans le café torréfié selon la température :

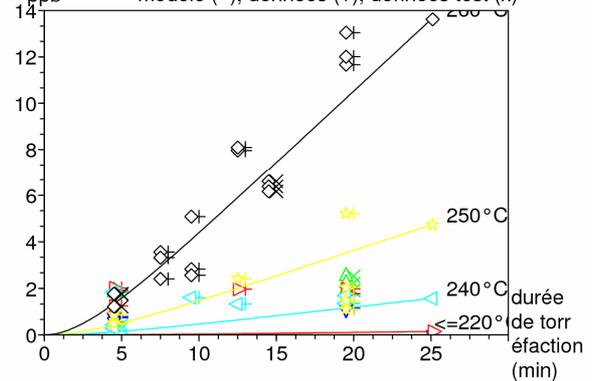


Figure 4.13 : Comparaison des données expérimentales et des valeurs simulées par le modèle cinétique pour la formation du benzo[a]anthracène et du chrysène au cours de la torréfaction du café.

L'ajustement du modèle et sa validation ont été réalisées avec deux lots de café Arabica (provenant de Cuba) différents (voir **Figure 4.14**). Les données obtenues avec du café

ENSIA, utilisées pour l'ajustement non-linéaire sont représentées avec des symboles (+) et les données obtenues avec du café INA, utilisées pour la validation du modèle, sont représentées avec les symboles (x).

Tableau 4.9 : Valeurs apparentes ajustées pour les paramètres du modèle dans le cas du benzo[a]anthracène et du chrysène.

Paramètres	Valeurs ajustées	
	Benzo[a]anthracène	Chrysène
$K_1 = k_{01} \cdot [R_1] \cdot [R_2]$	3.72×10^{-44}	3.72×10^{-44}
E_{a1} (kJ.mol ⁻¹)	128	104
$K_2 = k_{02} \cdot [R_3]$	0.640	0.0517
E_{a2} (kJ.mol ⁻¹)	246	170
$K_3 = k_{03}$	2900	0.0011
E_{a3} (kJ.mol ⁻¹)	46.7	99.1
$K_4 = k_{04} \cdot [R_5]$	7.20×10^{-6}	64.0
E_{a4} (kJ.mol ⁻¹)	33.3	33.3
$[R_{3,t=0}]$	194	403

K_{01} , K_{02} , K_{03} et K_{04} sont en mol⁻¹.s⁻¹; K_1 en mol.s⁻¹; K_2 en s⁻¹; K_3 en mol⁻¹.s⁻¹; K_4 en s⁻¹; E_{a3} : Energie de formation des HAP. E_{a4} : Energie de disipation des HAP

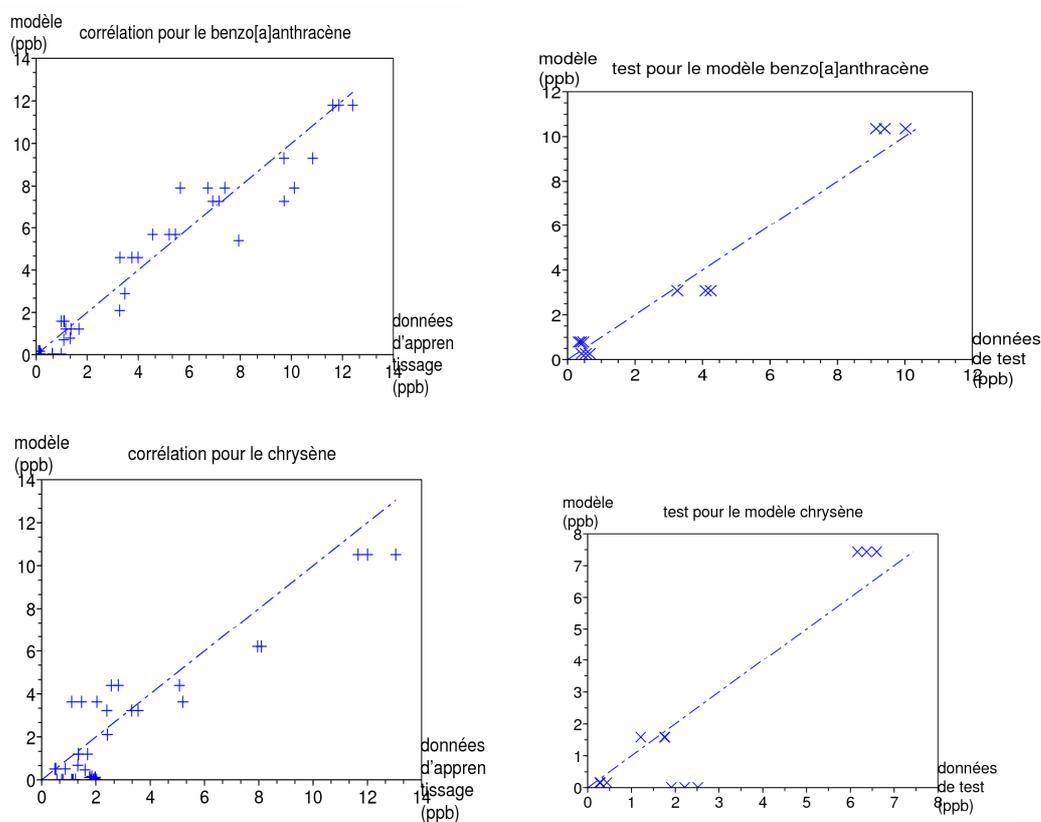


Figure 4.14 : Résultats obtenus pour les deux lots de café utilisés soit pour l'ajustement du modèle, soit pour sa validation.

4.2.3.2 Modélisation à l'aide d'un réseau de neurones artificiel

Un réseau de neurones est un modèle de calcul dont la conception est schématiquement inspirée du fonctionnement de vrais neurones (ex : neurones humains). Ce réseau possède généralement plusieurs entrées, et une ou plusieurs sorties. Dans sa version la plus simple, un réseau formel calcule la somme pondérée des entrées reçues, puis applique à cette valeur une fonction d'activation, généralement non linéaire. La valeur finale obtenue est la sortie du réseau de neurones. Ce modèle reste une "boîte noire" qui fournit une réponse quand on lui présente une donnée, mais il n'offre pas de justification facile à interpréter sur la façon dont celle-ci est obtenue. Cependant ce type de modélisation a déjà permis de modéliser certains procédés, notamment de séchage [Hernandez-Perez et al. (2004)].

Le modèle le plus utilisé est le modèle multi-couches, avec une couche d'entrée, une couche de sortie, et une ou plusieurs couche(s) cachée(s). Ainsi, pour prédire la formation des HAP par combustion dans certaines flammes, Inal (2006) a utilisé un réseau de neurones à une seule couche cachée comportant 5 neurones.

Dans ce travail nous avons testé ce modèle en considérant un réseau de neurones par HAP, de manière à avoir 1 variable de sortie (i.e. la concentration en HAP estimées dans nos expériences pour une durée et température de torréfaction données) et 2 variables d'entrée (i.e. la durée et la température de torréfaction). Ceci se justifie par le fait que les conditions de torréfaction (durée, température) peuvent affecter chaque HAP de manière différente. Pour effectuer les simulations, 3 cas ont été testés : un réseau avec 1, 2 ou 3 neurone(s) sur la couche cachée. Le cas d'un réseau à 3 neurones est illustré sur la **Figure 4.12**.

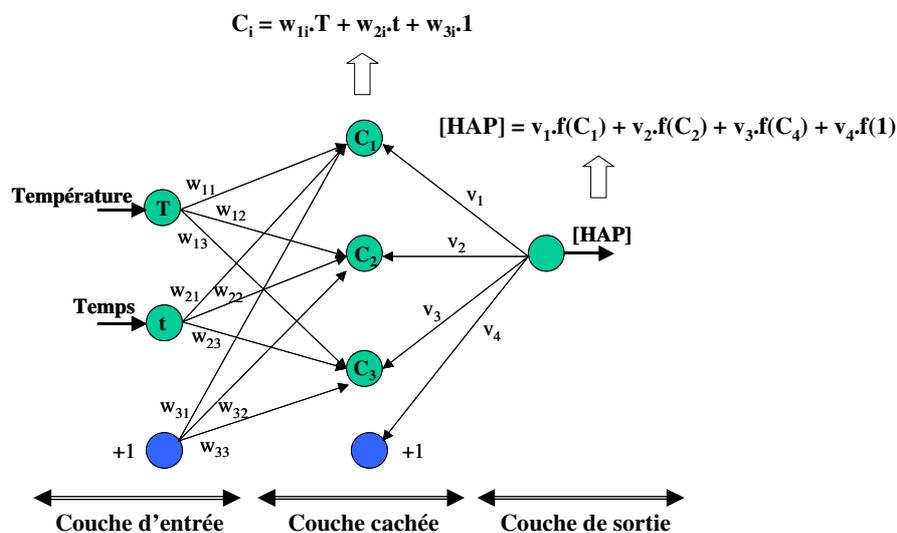


Figure 4.15 : Illustration d'un réseau de neurones comportant 3 neurones sur la couche cachée.

Dans ce modèle les valeurs des neurones (notées C_i) sont une combinaison linéaire des valeurs des 2 entrées (T et t) pondérées par leurs « poids » w_{ij} (w_{31} étant considéré comme le biais). Pour simuler ensuite la concentration en HAP, chaque valeur de neurone est activée, par une fonction dite d'activation ; la concentration en HAP simulée donnée par le modèle est une pondération par les « poids » v_i de ces fonctions. Nous avons utilisé comme fonction d'activation fonction une sigmoïde de type :

$$f(C_i) = 1 / [1 + \exp(-C_i)]$$

Par suite, la concentration simulée pour en HAP est donnée par :

$$[\text{HAP}]_{\text{simul}} = v_1 / [1 + \exp(-C_1)] + v_2 / [1 + \exp(-C_2)] + v_3 / [1 + \exp(-C_3)] + v_4 / [1 + \exp(-1)]$$

Plus le nombre de neurones est important, plus le nombre de paramètres à déterminer est important (« poids » w_{ij} et w_i). Ainsi avec 3 neurones on a 13 paramètres, contre seulement 9 et 5 respectivement avec 2 et 1 neurone(s). Pour évaluer les différents paramètres, le modèle ajuste les valeurs de manière à minimiser la fonction d'erreur définie comme la somme des carrés des erreurs :

$$E = ([\text{HAP}]_{\text{simul}} - [\text{HAP}]_{\text{exp}})^2$$

Chaque modèle a été testé, et les résultats quant aux sommes des carrés des erreurs obtenues sont donnés dans le **Tableau 4.10**.

Tableau 4.10 : Sommes des carrés des erreurs (entre les valeurs données par le modèle et les concentrations estimées par nos analyses) pour chaque HAP selon le modèle testé (pour ces simulations, seules les expériences menées avec le café vert ENSIA torréfié ont été considérées).

	Somme des carrés des erreurs		
	1 neurone	2 neurones	3 neurones
Ace	0.498487	0.033974	0.020003
Fluorene	0.171570	0.024595	0.020034
Phen	0.415674	0.186041	0.093597
Anthr	0.291687	0.020000	0.020007
F	0.450454	0.105514	0.062630
Pyr	0.020004	0.020050	0.020001
B[a]A	0.064871	0.045213	0.039113
Chrys	0.060321	0.053151	0.043922
B[b]F	0.556428	0.249798	0.098919
B[k]F	1.799221	0.624662	<u>0.313376</u>
B[a]P	0.551166	0.145399	0.057507
DB[ah]A	0.132067	0.076520	0.040843
B[ghi]P	0.182248	0.102822	0.071700

On constate que dans l'ensemble c'est le réseau à 3 neurones qui donne les meilleurs résultats, même si pour le pyrène et l'anthracène un réseau à respectivement 1 et 2 neurone(s) suffit. Dans le cas du benzo[k]fluoranthène aucun modèle n'est pas pertinent puisque la somme des carrés des erreurs reste élevée ; compte tenu des faibles concentrations estimées pour ce composé et de la forte incertitude sur les concentrations estimées, ce résultat n'est pas surprenant.

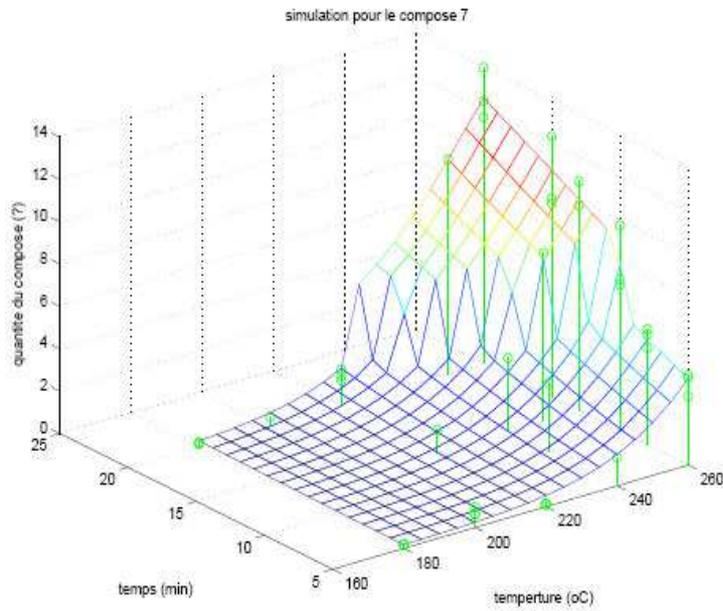
Il est toutefois nécessaire d'établir un compromis entre la somme des carrés des erreurs obtenue et le nombre de paramètres déterminés ; en effet plus il y a de paramètres dans le modèle, et moins celui-ci est pertinent (il y a risque d'« over-fitting »). Par conséquent nous avons choisi de conserver le modèle à 2 neurones. Les résultats complets concernant les simulations observées pour chaque HAP, et les corrélogrammes entre les concentrations estimées et les valeurs données par le modèle, sont donnés dans l'**annexe 10**. A titre d'exemple les résultats concernant le benzo[a]anthracène et le chrysène sont donnés dans la **Figure 4.16**.

Pour réaliser ces simulations nous avons utilisé les valeurs obtenues pour chaque essai, et non les valeurs moyennes. Donc on tient compte à la fois de l'erreur due au modèle et de l'erreur due à la mesure.

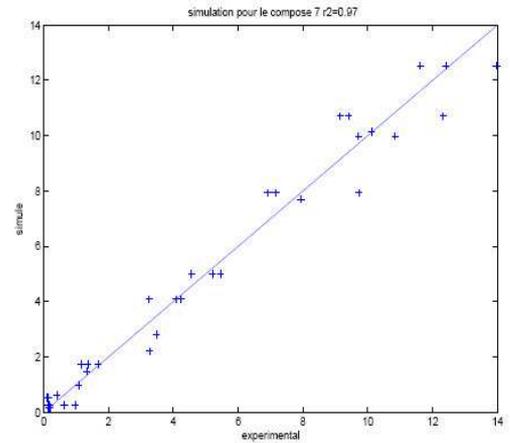
On observe une corrélation tout à fait satisfaisante dans le cas du benzo[a]anthracène (coefficient de corrélation $r^2 = 0.973$), ainsi que de l'acénaphène ($r^2 = 0.950$), du fluorène ($r^2 = 0.986$), de l'anthracène ($r^2 = 0.955$), et du pyrène ($r^2 = 0.970$). Par contre pour d'autres composés la corrélation est moins pertinente : phénanthrène ($r^2 = 0.897$), fluoranthène ($r^2 = 0.911$), chrysène ($r^2 = 0.931$), benzo[g,h,i]pérylène ($r^2 = 0.921$). Enfin le modèle n'est pas probant pour le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène, le benzo[a]pyrène, le dibenzo[a,h]-anthracène ($r^2 = 0.737-0.867$) ; ceci peut s'expliquer par les très faibles teneurs de ces composés qui induisent une imprécision importante sur les concentrations estimées expérimentalement.

L'intérêt de ce type de modélisation est de prédire rapidement les concentrations en HAP lorsque la torréfaction est réalisée pendant un temps donné à une température fixée, et ainsi d'en déduire rapidement un facteur d'équivalent toxique approximatif. Il est donc possible ensuite de déterminer quelle(s) durée(s) et température(s) maximales peuvent être mises en oeuvre pour obtenir un café de qualité organoleptique satisfaisante avec un équivalent toxique le plus faible possible. Dans le cadre de ce travail, il ne nous a pas été possible d'atteindre cet objectif compte tenu du manque de précision de certaines de nos expériences.

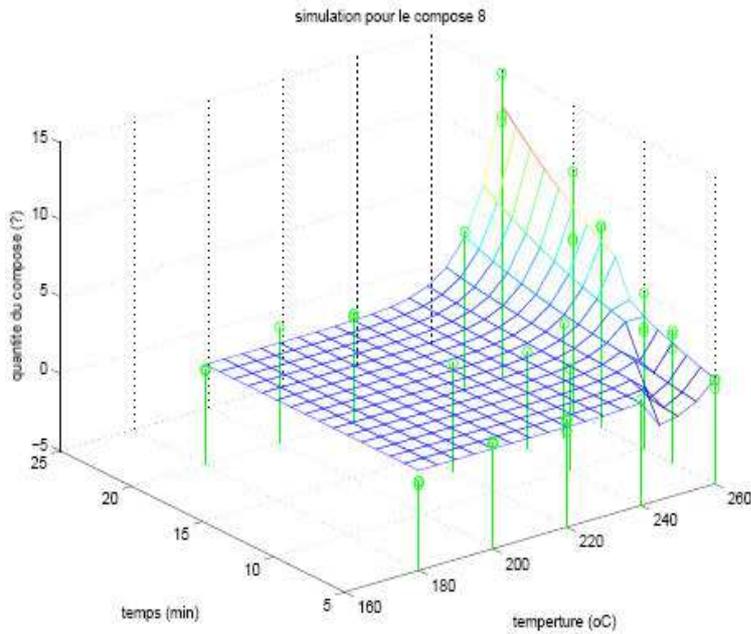
Simulation pour le benzo[a]anthracène



Corrélogramme du benzo[a]anthracène



Simulation pour le chrysène



Corrélogramme du chrysène

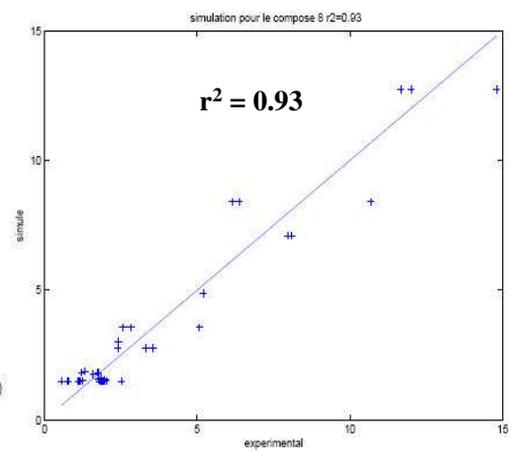


Figure 4.16 : Résultats du modèle à 2 neurones sur la couche cachée pour le benzo[a]anthracène et le chrysène : surfaces de réponse (les points verts correspondent aux concentrations estimées d'après nos analyses) et corrélations obtenues entre les données expérimentales et les données simulées.

4.2.4 Confirmation de la présence des HAP dans les cafés torréfiés

Pour confirmer la présence des HAP dans nos échantillons de cafés torréfiés nous avons réalisé des analyses des extraits par HPLC-UV-DAD ainsi que GC-MS/MS.

4.2.4.1 Identification des HAP par HPLC-UV-DAD

Pour réaliser l'identification nous avons comparé les spectres UV des pics ayant le même temps de rétention que les HAP avec les spectres de ces composés obtenus dans des solutions standards (réalisées dans le même solvant que l'échantillon). En raison du manque de sensibilité du détecteur UV nous n'avons pas pu confirmer la présence de tous les HAP. Seuls 4 d'entre eux ont pu être confirmés par cette technique ; il s'agit du fluorène, phénanthrène, pyrène et fluoranthène. Les superpositions des spectres UV obtenus sont présentées sur la **Figure 4.17**.

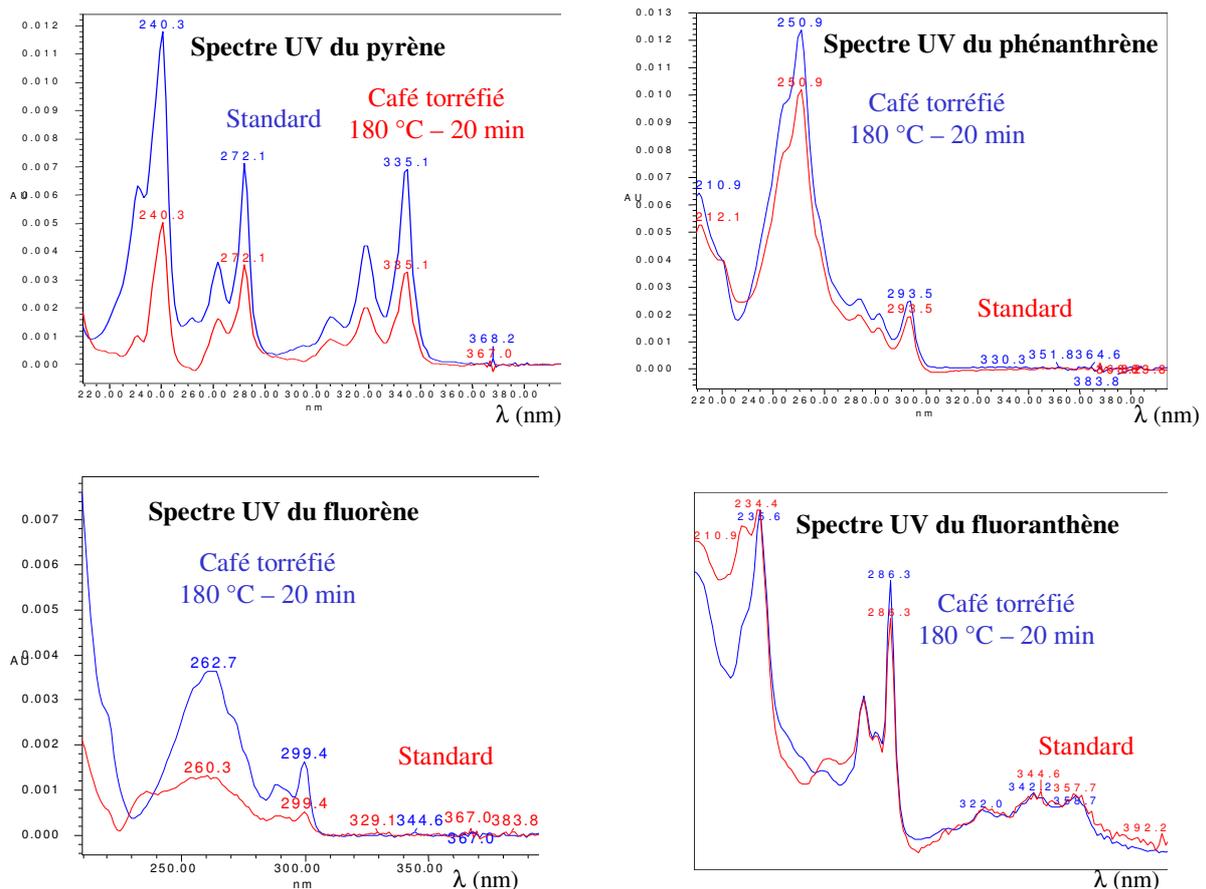


Figure 4.17 : Confirmation de la présence de 4 HAP par superposition des spectres UV obtenus avec ceux de solutions standards.

4.2.4.2 Identification des HAP par GC-MS/MS

Pour confirmer davantage de composés nous avons eu recours à l'analyse par GC-MS/MS. Le **Figure 4.18** présente la comparaison d'un chromatogramme obtenu par cette technique pour un échantillon de café torréfié avec celui d'une solution standard contenant les 16 HAP.

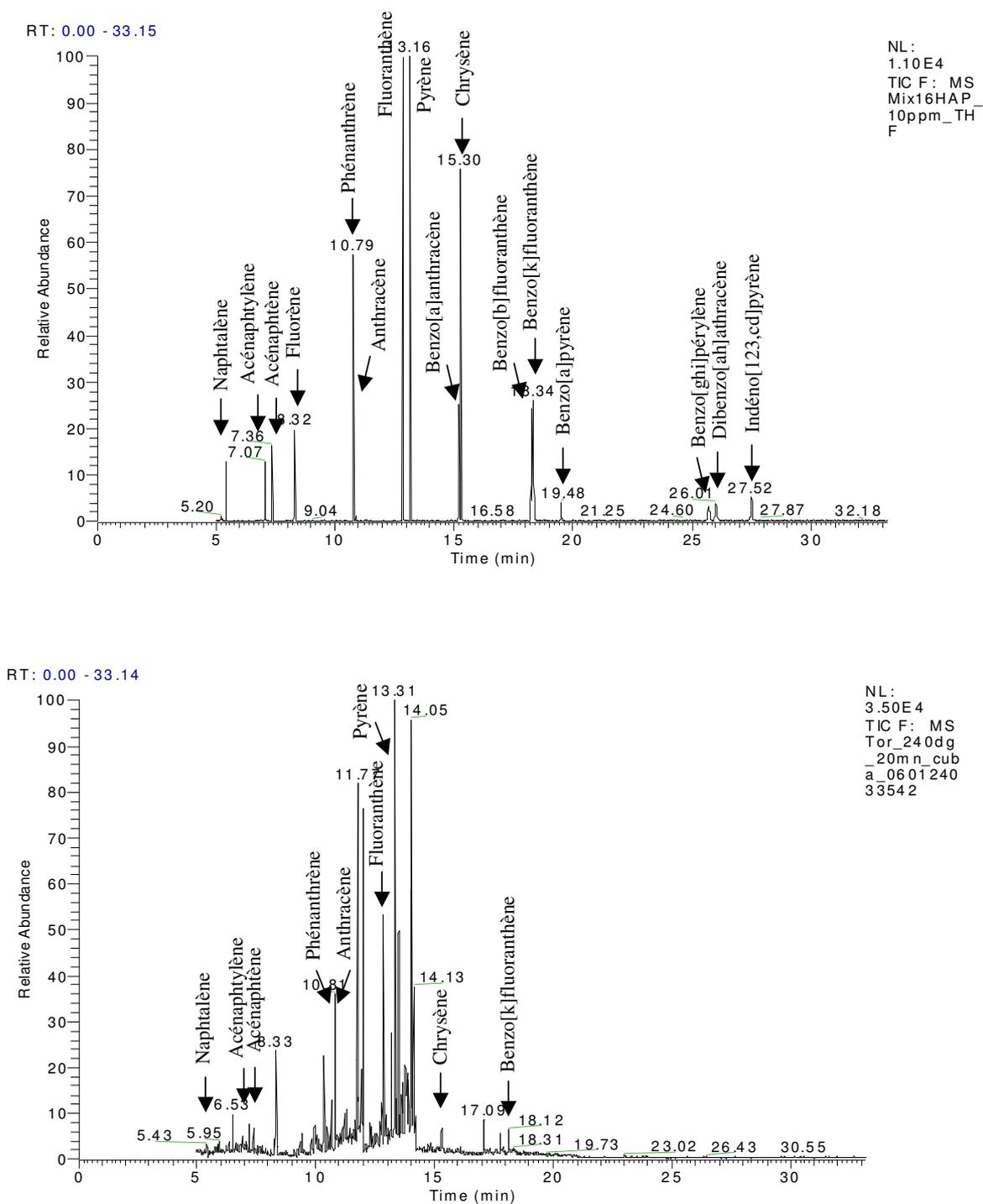


Figure 4.18 : Comparaison du chromatogramme de la solution étalon des 16HAP (10ppm) et d'un autre chromatogramme de nos échantillons (café torréfié à 240°C, 20 min).

Les spectres MS² obtenus pour les pics ayant les mêmes temps de rétention que les HAP recherchés sont présentés en détail dans l'annexe 11. La **Figure 4.19** illustre les résultats obtenus pour le chrysène et le benzo[k]fluoranthène.

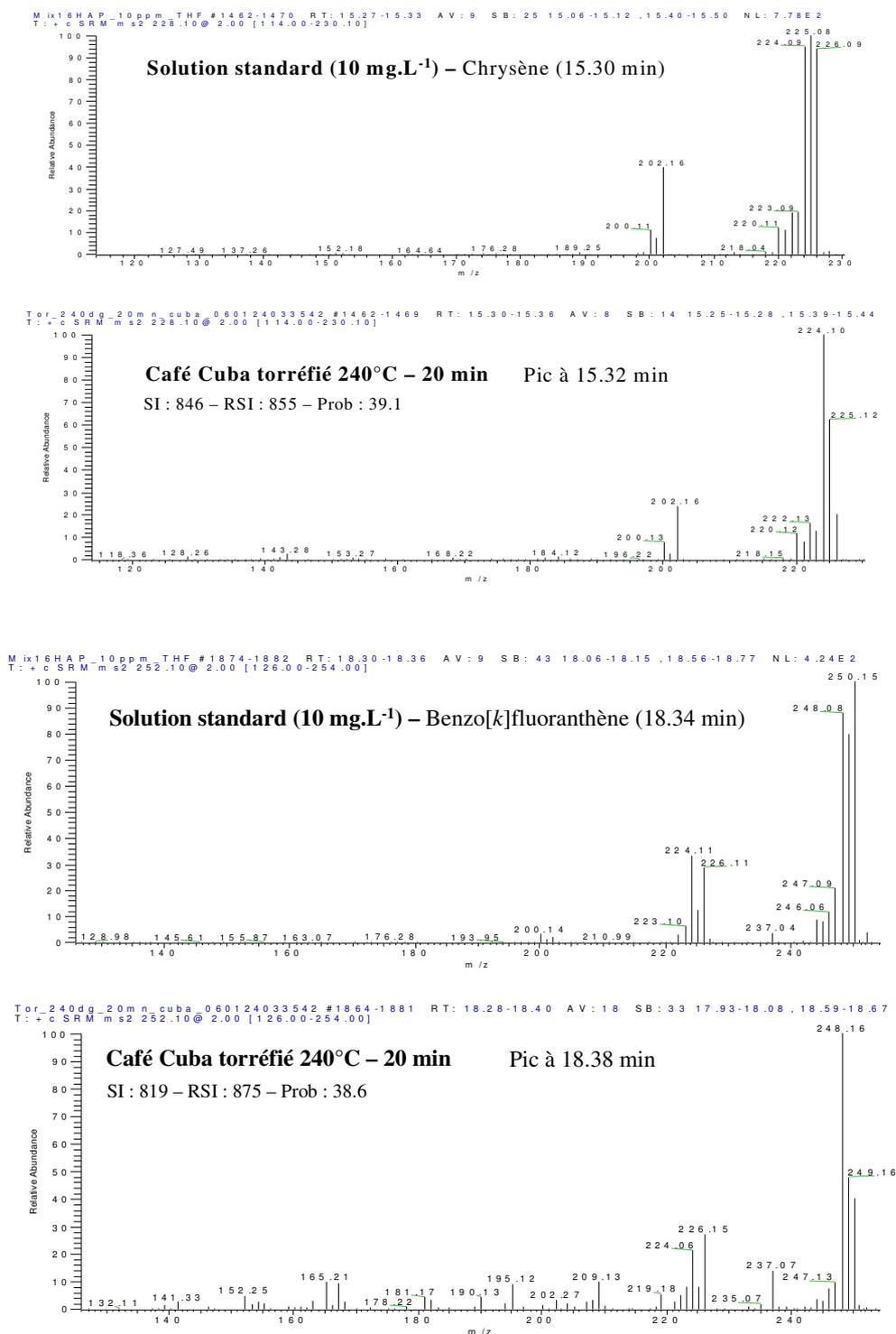


Figure 4.19 : Comparaison des spectres de masse MS² obtenus pour le chrysène et le benzo[k]fluoranthène dans une solution standard et un échantillon de café Cuba torréfié à 240°C pendant 20 min.

En cumulant les informations issues des spectres de masse et des temps de rétention des HAP étudiés, nous pouvons conclure à l'existence des HAP suivants dans le café : naphthalène, acénaphthylène, acénaphène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène et benzo[a]pyrène.

4.2.5 Conclusion

L'étude des conditions de torréfaction de deux cafés vert Arabica issus de la même origine (i.e. Cuba) met en évidence la formation de certains HAP durant cette étape de préparation du café. Cette formation est d'autant plus importante que la durée et la température de torréfaction sont élevées. En vue d'évaluer les risques pour le consommateur, il faut donc estimer les coefficients de transfert vers le café boisson de ces molécules.

4.3 Etude des concentrations en HAP des cafés boissons

La structure des grains de café torréfiés dépend étroitement des conditions de torréfaction, en particulier sa porosité. Par conséquent il est possible que le passage des HAP du café torréfié moulu vers le café boisson dépende de l'état de torréfaction du grain. Il nous a donc paru intéressant d'analyser les HAP dans les cafés boissons préparés à partir des différents cafés torréfiés afin d'estimer les pourcentages de transfert des HAP, et par la suite de voir si ceux-ci sont affectés par les conditions de torréfaction.

4.3.1 Analyse des cafés boissons préparés à partir de cafés torréfiés pendant 5 min

Après avoir torréfié le café en grains à différentes températures pendant 5 min, nous avons obtenu le café boisson en utilisant le même protocole que précédemment. Après traitement des échantillons de café boisson ainsi obtenus et analyse des extraits finaux par HPLC-FD nous avons donc estimé les concentrations en HAP dans la boisson. Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau 4.11**.

Les HAP à 3 et 4 cycles sont prédominants dans tous les échantillons (à chaque température) et représentent 98.7 à 99.6% des HAP contenus dans les cafés boissons analysés. Il s'agit surtout du phénanthrène, fluoranthène et pyrène, comme pour le café moulu. Si le phénanthrène paraît peu affecté par le degré de torréfaction du café, il semble que la concentration du fluoranthène et du pyrène augmente pour les hautes températures de torréfaction, surtout à 260°C. On observe la même tendance pour le benzo[a]anthracène, avec à 260°C une concentration dans le café boisson estimée à 0.15 µg.L⁻¹. Pour les HAP à 5 et 6 cycles, le benzo[b]fluoranthène et le benzo[k]fluoranthène ont été détectés, mais à de très faibles concentrations. Des traces de benzo[a]pyrène ont également été relevées pour le café

fortement torréfié. Quant au dibenzo[*a,h*]anthracène et au benzo[*g,h,i*]pérylène, ils restent indétectables dans le café boisson.

Tableau 4.11 : Concentrations moyennes en HAP dans le café boisson obtenu après torréfaction du café en grains à différentes températures pendant 5 min.

nd : non détecté (valeurs inférieures aux LOD estimées ; les LOD ont été estimées en se basant sur les LOD analytiques dans l'extrait de 0.4 mL précédemment évaluées dans le chapitre 3, et en considérant la prise d'essai de 50 mL de café boisson).

	Température de l'air entrant dans le torréfacteur									
	200°C		220°C		240°C		250°C		260°C	
	Conc. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)
Ace*	traces	----	0.045	6.44	0.10	6.36	0.036	4.05	0.043	6.4
Fluorene*	traces	----	nd	----	traces	----	nd	----	nd	----
Phen	0.21	6.20	0.49	13.47	0.33	1.45	0.42	13.29	0.49	6.62
Anthr	traces	----	traces	----	traces	----	traces	----	traces	----
F	0.39	2.36	0.44	2.22	0.17	1.06	0.35	0.24	0.76	6.37
Pyr	0.16	3.25	0.18	3.55	0.062	1.22	0.13	0.94	0.29	5.81
B[a]A	0.031	3.83	traces	----	0.0246	3.09	0.082	5.49	0.15	2.11
Chrys	0.087	3.11	0.14	6.14	0.024	3.49	0.046	4.17	0.11	3.47
B[b]F	traces	----	traces	----	traces	----	traces	----	traces	----
B[k]F	traces	----	traces	----	traces	----	traces	----	traces	----
B[a]P	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----	traces	----
DB[ah]A	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----
B[ghi]P	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----
Σ 13 HAP	0.90		1.32		0.74		1.08		1.86	
Σ 11 HAP	0.89		1.28		0.62		1.04		1.82	
Σ HAP toxiq	0.52		0.61		0.23		0.49		1.04	
Σ HAP carcin	0.12		0.16		0.056		0.13		0.27	
TEQ (13 HAP)	0.0084		0.0083		0.0053		0.013		0.025	
TEQ (11 HAP)	0.0084		0.0082		0.0052		0.013		0.025	

La somme des 11 HAP varie de 0.62 à 1.82 $\mu\text{g.L}^{-1}$, la concentration la plus élevée étant obtenue à 260°C. Elle reste assez stable entre 200 et 250°C (0.62-1.28 $\mu\text{g.L}^{-1}$), malgré une concentration plus faible observée à 240°C (peut-être liée au manque de précision de nos mesures), pour augmenter sensiblement entre 250 et 260°C. Concernant les HAP carcinogènes, on observe la même tendance : relative stabilité entre 200 et 250°C (0.12-0.16 $\mu\text{g.L}^{-1}$), avec une légère baisse à 240°C (0.056 $\mu\text{g.L}^{-1}$), puis augmentation entre 250 et 260°C (0.27 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Selon les valeurs obtenues, l'équivalent toxique du café boisson reste proche de 0.005-0.015 $\mu\text{g.L}^{-1}$ entre 200 et 250°C, avant de passer à 0.025 $\mu\text{g.L}^{-1}$ lorsque le café a été torréfié à 260°C.

Une même étude a été faite sur les échantillons de café torréfiés aux mêmes températures avec une durée de torréfaction prolongée (20 min).

4.3.2 Analyse des cafés boissons préparés à partir de cafés torréfiés pendant 20 min

Les concentrations estimées pour les différents HAP identifiés dans les cafés boissons issus des cafés torréfiés pendant 20 min sont données dans le **Tableau 4.12**.

Tableau 4.12 : Concentrations moyennes en HAP dans le café boisson obtenu après torréfaction du café en grains à différentes températures pendant 20 min.

nd : non détecté (valeurs inférieures aux LOD estimées ; les LOD ont été estimées en se basant sur les LOD analytiques dans l'extrait de 0.4 mL précédemment évaluées dans le chapitre 3, et en considérant la prise d'essai de 50 mL de café boisson).

	Température de l'air entrant dans le torréfacteur									
	200°C		220°C		240°C		250°C		260°C	
	Conc. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	RSD (%)
Ace*	0.026	19.1	0.03	21.4	0.15	25.2	0.055	30.1	0.064	8.98
Fluorene*	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----
Phen	0.21	2.64	0.42	10.51	0.26	20.7	0.17	17.24	0.45	1.06
Anthr	traces	-----	traces	-----	traces	-----	traces	-----	0.019	12.9
F	0.22	3.15	0.16	0.68	0.27	0.26	0.34	16.01	0.79	13.2
Pyr	0.12	1.54	0.093	1.3	0.078	1.89	0.15	4.7	0.37	12.65
B[a]A	traces	-----	0.014	30.06	traces	-----	traces	-----	0.02	13.65
Chrys	0.048	20.6	0.027	5.14	0.020	1.7	0.021	2.11	0.087	10.58
B[b]F	traces	-----	traces	----	traces	-----	traces	-----	nd	-----
B[k]F	nd	-----	traces	----	traces	----	traces	----	traces	----
B[a]P	traces	----	traces	----	nd	-----	traces	----	nd	-----
DB[ah]A	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----
B[ghi]P	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----	nd	-----
Σ 13 HAP	0.64		0.75		0.80		0.76		1.80	
Σ 11 HAP	0.61		0.72		0.65		0.70		1.74	
Σ HAP toxiq	0.28		0.21		0.31		0.38		0.92	
Σ HAP carcin	0.057		0.041		0.035		0.036		0.11	
TEQ (13 HAP)	0.0036		0.0034		0.0045		0.0052		0.011	
TEQ (11 HAP)	0.0036		0.0033		0.0044		0.0051		0.011	

Les profils en HAP des différents cafés boissons sont similaires à ceux obtenus précédemment avec seulement 5 min de torréfaction. A nouveau les HAP à 3 et 4 cycles représentent environ 99% du total en HAP analysés. Seules des traces sont observées pour certains composés à 5 cycles, tels que le benzo[*b*]fluoranthène, le benzo[*k*]fluoranthène et le benzo[*a*]pyrène ; pour ce dernier, les teneurs reportées dans la littérature varient entre non détecté et 0.007 $\mu\text{g.L}^{-1}$ comme indiqué dans le chapitre 1. Comme précédemment ces résultats sont cohérents, d'une part avec le profil en HAP des cafés moulus correspondants, et d'autre part avec les valeurs de solubilité dans l'eau de ces différents HAP.

Parallèlement la somme des HAP subit une augmentation sensible entre 250 et 260°C. Ainsi si on considère les 11 HAP, leur somme passe de 0.61-0.72 (entre 200-250°C) à 1.74 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (à 260°C). La part des HAP carcinogènes reste relativement stable, variant entre 5.1 et 9.3% (pourcentage estimé sur la base des 11 HAP seulement, compte tenu de l'incertitude associée à l'acénaphène et au fluorène). L'équivalent toxique du mélange des HAP reste proche de 0.005-0.010 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour tous les échantillons. La toxicité plus importante estimée pour le café torréfié pendant 5 min à 260°C est principalement liée à des concentrations plus élevées en benzo[*a*]anthracène dans ce café (0.013-0.15 $\mu\text{g.L}^{-1}$) par comparaison avec le café torréfié pendant 20 min (0.0076-0.014 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

4.3.3 Estimation des coefficients de transfert des HAP du café torréfié vers le café boisson

La présence des HAP dans le café torréfié et les risques de transfert vers le café boisson méritent une attention particulière afin de garantir la sécurité sanitaire des consommateurs. Il est donc nécessaire d'évaluer le potentiel toxique de ces HAP dans le café torréfié que dans le café boisson, et de déterminer leur coefficient de transfert vers le café boisson.

Ainsi les résultats obtenus dans le cas de la torréfaction du café pendant 5 min et 20 min sont rassemblés dans les **Tableaux 4.13 et 4.14** respectivement.

Les valeurs estimées pour les coefficients de transfert varient grandement, d'un composé à l'autre, et parfois d'un échantillon de café à l'autre. Malgré tout on obtient des valeurs assez homogènes pour le phénanthrène (13.9-30.1% à 5 min, 1.5-11.5% à 20 min), le fluoranthène (22.5-30.4% à 5 min, 11.8-23.0% à 20 min), et le pyrène (17.9-28.4% à 5 min, 2.8-13.9% à 20 min) ; ces valeurs sont en accord avec celles que nous avons précédemment estimées pour des échantillons de café du commerce comme présenté dans le chapitre 3. La baisse observée à 20 min pourrait s'expliquer par une saturation de la boisson en ces HAP, en raison des concentrations en HAP plus élevées pour ces cafés moulus.

Tableau 4.13 : Coefficients de transfert (C_t) estimés pour les HAP dans le café boisson obtenu à partir de café torréfié pendant 5 min à différentes températures.

	Température de l'air entrant dans le torréfacteur									
	200°C		220°C		240°C		250°C		260°C	
	C_t (%)	RSD (%)	C_t (%)	RSD (%)	C_t (%)	RSD (%)	C_t (%)	RSD (%)	C_t (%)	RSD (%)
Ace*	1.69	16.35	5.79	6.22	2.87	8.45	0.82	14.10	5.42	27.48
Fluorene*	20.20	28.82	---	---	32.84	19.86	---	---	---	---
Phen	13.89	7.36	30.12	25.78	28.61	12.54	15.25	13.70	23.37	22.19
Anthr	2.95	12.72	2.16	26.27	3.47	9.88	2.70	18.30	2.00	7.27
F	22.74	12.37	23.46	18.92	22.55	10.10	30.37	17.39	27.70	16.00
Pyr	17.93	4.51	19.83	18.38	19.41	3.26	28.42	23.93	17.58	24.07
B[a]A	16.58	20.35	42.83	6.56	24.35	15.89	30.94	5.41	15.53	14.93
Chrys	18.77	3.10	32.42	0.74	29.63	25.33	29.21	28.79	27.88	28.34
B[b]F	---	---	24.30	0.29	7.46	49.20	6.00	66.18	4.64	28.50
B[k]F	0.00	68.00	0.00	8.15	6.91	12.13	8.00	8.91	4.80	11.50
B[a]P	0.00	---	0.00	---	---	---	0.00	---	0.00	---
DB[ah]A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B[ghi]P	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tableau 4.14 : Coefficients de transfert (C_t) estimés pour les HAP dans le café boisson obtenu à partir de café torréfié pendant 20 min à différentes températures.

	Température de l'air entrant dans le torréfacteur									
	200°C		220°C		240°C		250°C		260°C	
	C_t (%)	RSD (%)	C_t (%)	RSD (%)	C_t (%)	RSD (%)	C_t (%)	RSD (%)	C_t (%)	RSD (%)
Ace*	1.46	0.87	2.47	29.86	1.65	47.03	1.92	39.34	2.95	11.87
Fluorene*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phen	11.27	3.09	11.51	12.34	5.75	15.19	1.51	9.49	10.36	5.26
Anthr	1.98	0.17	2.23	16.12	0.63	21.00	0.98	23.22	3.51	14.04
F	17.62	5.64	14.75	12.58	23.03	2.04	11.83	16.00	18.02	5.45
Pyr	13.82	2.95	14.33	13.13	13.62	17.09	9.90	16.06	2.79	2.53
B[a]A	5.67	48.38	4.01	47.58	1.30	5.65	0.80	13.87	0.63	9.20
Chrys	8.67	35.81	5.86	1.40	5.44	10.85	5.45	29.74	2.71	1.48
B[b]F	3.46	34.21-	0.00	75.29	5.09	18.61	2.34	21.16	-	-
B[k]F	-	-	0.41	49.55	0.00	2.12	0.00	18.33	0.00	7.53
B[a]P	0.00	---	0.11	27.97	---	---	0.00	6.30	---	---
DB[ah]A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B[ghi]P	---	---	---	---	---	---	---	---	0.00	---

Nous avons essayé de voir si une tendance pouvait être observée entre les valeurs du coefficient de transfert et $1/\log K_{ow}$. Comme illustré sur la **Figure 4.20** ce n'est pas le cas (bien que nous ayons éliminé les HAP aux concentrations très faibles). En fait ceci peut s'expliquer en partie par la faible précision de certaines de nos mesures. On peut également supposer que cette corrélation n'est pas nécessairement vérifiée puisque le transfert des HAP dépend également des autres constituants du café (et ceux-ci sont modifiés par la torréfaction comme nous l'avons vu) et de la concentration en HAP du café.

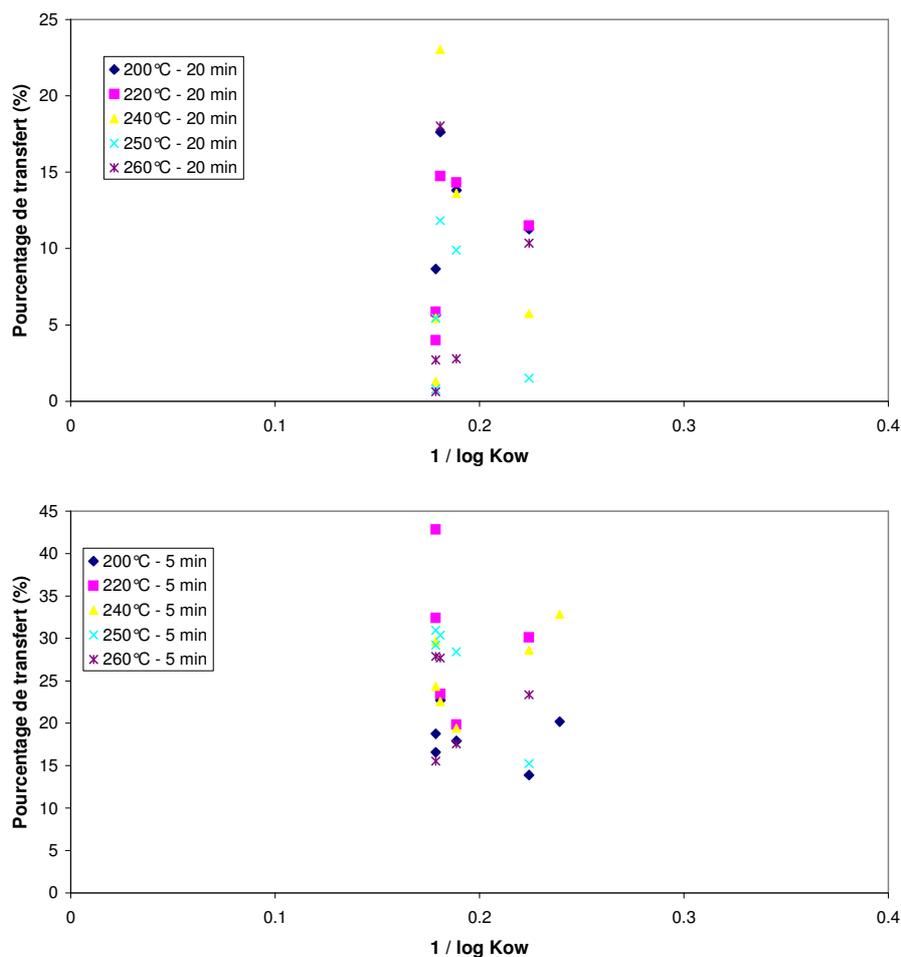


Figure 4.20 : Tentative de corrélation entre les coefficients de transfert estimés et l'inverse du logarithme du coefficient de partage octanol-eau des HAP (cafés de Cuba torréfiés dans différentes conditions).

4.3.4 Conclusion sur le café boisson

Dans le café boisson les HAP sont présents à de faibles concentrations. Les composés les plus toxiques (5-6 cycles), qui sont également les plus hydrophobes, ont des teneurs qui ne dépassent pas $0.01 \mu\text{g.L}^{-1}$. Comme pour le café moulu, ce sont essentiellement des HAP à 3 et 4 cycles qui sont retrouvés dans les échantillons, avec comme HAP majoritaires le

phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène. Quant aux coefficients de transfert ils sont très variables, mais ils ne dépassent pas 40%.

4.4 Conclusion

Cette étude menée sur des cafés de Cuba torréfiés sous diverses températures pendant deux durées différentes met en évidence la formation possible de plusieurs HAP selon les conditions de torréfaction. Il est donc nécessaire de maîtriser cette étape pour limiter la présence de ces composés dans le café moulu. Des analyses réalisées en HPLC-UV-DAD et HPLC-MS/MS ont permis de confirmer la présence des HAP dans nos échantillons. Il est intéressant de constater que les HAP les plus toxiques, dont le benzo[*a*]pyrène, sont généralement très peu concentrés dans les cafés moulus, et à l'état de traces uniquement dans les cafés boissons. Toutefois d'autres HAP toxiques sont présents, notamment le benzo[*a*]anthracène. Nos résultats laissent apparaître la formation de ce composé durant la torréfaction, et nous avons pu la simuler à l'aide d'un modèle cinétique et d'un réseau de neurones. Des résultats intéressants ont également été obtenus pour d'autres HAP, mais l'imprécision de certaines mesures nuit à leur validité. Par conséquent nous n'avons pas pu déterminer l'ordre apparent des réactions. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude, d'une part avec des expériences complémentaires, et d'autre part en torréfiant des précurseurs connus de manière à mieux appréhender les mécanismes de formation des HAP dans le café.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail était, d'une part le développement de méthodes analytiques en vue de l'identification et la quantification des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café moulu et le café boisson, et d'autre part l'étude des conditions de torréfaction (durée et température) sur les concentrations en HAP dans le café moulu et le café boisson.

Dans la première partie de ce travail nous avons étudié différentes méthodes d'extraction (PSE, Soxhlet) et de purification (SPE, saponification) pour l'analyse des HAP dans le café moulu. L'étude a été menée sur des ajouts connus de contaminants, tout en prenant en compte les concentrations en HAP natifs des échantillons, afin d'évaluer les taux de récupération. L'extraction PSE permet d'obtenir rapidement des rendements comparables à l'extraction par Soxhlet. Cependant la présence de nombreux interférents dans l'extrait recueilli, tout particulièrement des lipides, nécessite une purification poussée de celui-ci : une saponification, suivie d'un partage liquide-liquide, et d'une purification par SPE sur silice. Les taux de récupération pour la procédure analytique complète sont très satisfaisants et répétables après analyse en HPLC-FD. Les limites de détection estimées varient de 0.11 à 0.18 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, et l'application de cette procédure analytique à différents échantillons de cafés moulus a permis la détermination de 11 HAP, ainsi qu'une estimation de l'équivalent toxique. L'utilisation des couplages HPLC-UV-DAD et GC-MS/MS nous a permis de confirmer la présence de 13 HAP : naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène et benzo[a]pyrène. Les composés à 3 et 4 cycles sont cependant nettement majoritaires.

Dans le cas du café boisson, nous nous sommes attachés à mettre au point l'extraction en phase solide (SPE), en étudiant la nature et la masse de support, ainsi que la nature et le volume du solvant d'élution. Nous avons finalement retenu une extraction sur 0.5 g de copolymère styrène-divinylbenzène avec comme éluant le mélange MeOH/THF 10/90. Toutefois, en dépit de taux de récupération satisfaisants, la présence de composés interférents nous a conduit à préférer au final une saponification directe de l'échantillon, suivie d'un partage liquide-liquide et d'une purification par SPE sur silice. L'application cette méthode à divers cafés boissons nous a permis d'évaluer l'équivalent toxique du mélange des HAP présents et d'estimer leur coefficient de transfert.

Dans la seconde partie de ce travail nous avons appliqué ces méthodes analytiques au suivi des HAP dans des échantillons de cafés verts et torréfiés sous différentes conditions de température et de durée. Tout d'abord nous avons étudié l'influence de la durée de torréfaction à une température fixe (260°C), afin de suivre les cinétiques de formation éventuelle des composés. Nous avons ainsi, sur la base d'un modèle simplifié, tenté de déterminer les ordres apparents de formation de quelques composés (tels que benzo[*a*]anthracène et chrysène), et d'évaluer les constantes de vitesse. Ensuite nous avons étudié l'influence de la température sur la formation des HAP à des durées constantes (5 et 20 min). On observe la formation de plusieurs composés vers 240-260°C. Pour mieux appréhender l'effet des conditions de torréfaction (durée, température) sur la formation du benzo[*a*]anthracène et du chrysène, nous avons testé deux modèles cinétiques : l'un basé sur la loi d'Arrhénius, et l'autre sur un réseau de neurones. Les corrélations entre données expérimentales et valeurs simulées sont satisfaisantes pour ces deux composés. Par contre les résultats sont moins probants pour les autres HAP en raison du manque de précision des concentrations estimées.

Au vu de ces différents résultats, un certain nombre de perspectives de travail s'offrent à nous. Tout d'abord il nous semble important de réaliser des expériences complémentaires sur l'étude de la torréfaction, afin de valider les modèles proposés ou de les améliorer si nécessaire. L'étude poussée de ces différents modèles pourrait permettre de déterminer à terme des conditions (durée, température) à ne pas dépasser pour obtenir un café torréfié possédant à la fois une qualité organoleptique satisfaisante et des concentrations minimales en HAP. Parallèlement il conviendra d'effectuer des torréfactions de précurseurs donnés, afin de mieux appréhender les mécanismes de formation des HAP au cours de cette étape.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- AFSAA Saisine n° 2000-SA-0005, Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments relatif à une demande d'avis sur l'évaluation des risques présentés par le benzo(a)pyrène et par d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), présents dans diverses denrées ou dans certaines huiles végétales, ainsi que sur les niveaux de concentration en HAP dans les denrées au-delà desquels des problèmes de santé risquent de se poser, (2000).
- Akiyama M., Murakami K., et al. Analysis of volatile compounds released during the grinding of roasted coffee beans using solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003) **51**: 1961-1969.
- Amorim H.V., Basso L.C., Crocomo O.J., Teixeira A.A. Polyamines in green and roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1977) **2** : 957-958
- Andriot I., Le Quéré J. L., et al. Interactions between coffee melanoidins and flavour compounds: impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity. *Food Chemistry* (2004) **85**: 289-294.
- Aoshima H. et Ayabe S. Prevention of the deterioration of polyphenol-rich beverages. *Food Chemistry* (2007) **100**: 350-355.
- Araujo J. M. A. et Sandi D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry* (2007) **101**(3): 1087-1094.
- Badolato E. S. G., Martins M. S., Aued-Pimentela S., Alaburda J., Kumagaia E. E., Baptista G. G. et Rosenthalb A. Systematic Study of Benzo(a)Pyrene in Coffee Samples. *Journal of Brazilian Chemical Society* (2006).
- Bailey R.G, Ames J. M., et Mann J. Identification of New Heterocyclic Nitrogen Compounds from Glucose-Lysine and Xylose-Lysine Maillard Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2000) **48**: 6240-6246.
- Bak A. A. et Grobbee D. E. The effect on serum cholesterol levels of coffee brewed by filtering or boiling. *N Engl J Med* (1989) **321**(21): 1432-1437.
- Bell L. N., Wetzel C. R., et al. Caffeine content in coffee as influenced by grinding and brewing techniques. *Food Research International* (1996) **29**(8): 785-789.
- Bicchi C. P., Panero O. M., et al. Characterization of roasted coffee and coffee beverages by solid phase microextraction - Gas chromatography and principal component analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1997) **45**: 4680-4686.
- Britt P. F, Buchanan A. C., Kidder M. K., Owens V. C., Jr. Influence of steroid structure on the pyrolytic formation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* (2003) **66**: 71-95.
- Britt Ph. F., Buchanan A. C., Kidder M. K., Owens Jr C. V., Ammann J. R., Todd Skeen J. et Luo L. Mechanistic investigation into the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from the pyrolysis of plant steroids. *Fuel* (2001) **80**: 1727-1746.

- Britt Ph. F., Buchanan A. C., Owens Jr C. V. et Todd Skeen J. Does glucose enhance the formation of nitrogen containing polycyclic aromatic compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in the pyrolysis of praline ? *Fuel* (2004) **83**: 1417-1432.
- Café Malongo, La culture du café, <http://www.malongo.com/fr/public/culture.html>).
- Camargo M. C. R. et Toledo M. C. F. Cha-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromaticos (HPAS) na da dieta da população de Campinas. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas.* (2002) **22**(1): 49-53.
- Campa C., Doulbeau S., et al. Diversity in bean caffeine content among wild *Coffea* species : Evidence of a discontinuous distribution. *Food Chemistry* (2005) **91**: 633-637.
- Campa C., Doulbeau S., et al. Quantitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild *Coffea* species. *Food Chemistry* (2005) **93**(1): 135-139.
- Carrera F., Leon-Camach M., Pablos F. et Gonzalez A.G. Authentification of green coffee varieties according to their sterolic profile. *Analytica Chimica Acta* (1998) **370**: 131-139.
- Casal S., Mendes E., Oliveira M. B. P. P. et Ferreira M. M. Roast effects on coffee amino acid enantiomers. *Food Chemistry* (2005) **89**: 333-340.
- Casal S., Oliveira M. B. P. P. et Ferreira M. M. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chemistry* (2000) **68**: 481-485.
- Cavin C., Holzhaeuser D., et al. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food and Chemical Toxicology* (2002) **40**: 1155-1163.
- Cavin C., Mace K., et al. Protective effects of coffee diterpenes against aflatoxin B₁-induced genotoxicity : mechanisms in rat and human cells. *Food and Chemical Toxicology* (2001) **39**: 549-556.
- Chen B. H. et Chen Y. Ch. Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Smoke from Heated Model Lipids and Food Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001) **49**: 5238-5243.
- Chiu C. P., Lin Y. S. et Chen B. H. Comparison of GC-MS and HPLC for overcoming matrix interferences in the analysis of PAHs in smoked food. *Chromatographia* (1997) **44**(9/10): 497-503.
- Cirilo M. P. G., Coelho A. F. S., Araujo C. M., Gonçalves F. R. B., Nogueira A. R. A. et Gloria M. B. A. Profile and levels of bioactive amines in green and roasted coffee. *Food Chemistry* (2003) **82**: 397-402.
- Clarke RJ. "Quality Control in the Food Industry" (Coffee Technology), vol.4. 2^e ed. (1987) Academic Press, London.
- Comité Français du Café, Café, <http://www.cafes-negrta.fr/liensaut.html>.
- Conde F. J., Ayala J. H., Afonso A. M. et Gonzalez V. Optimization of a sampling method to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from incomplete biomass combustion. *Analytica Chimica Acta* (2004) **524**: 287-294.
- Costa Freitas A. M., Parreira C., et al. The use of electronic aroma-sensing device to assess coffee differentiation - Comparison with SPME gas chromatography-mass spectrometry

- aroma patterns. *Journal of Food Composition and Analysis* (2001) **14**: 513-522.
- Cremer D. R. et Eichner K. The reaction kinetics for the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and in plant powders. *Food Chemistry* (2000) **71**: 37-43.
- Debry G. « Le café. Sa composition, sa consommation, ses incidences sur la santé » (1995) Centre de Nutrition Humaine.
- De Kruijf N., Schouten A., et Van Der Stegen G.H.D. Présence de benzo(a)pyrène dans le café torréfié, le café instantané et le café boisson *Café Cacao Thé (Paris)*, (1987a) **31**(2) : 151-154.
- De Kruijf N., Schouten T., et Van Der Stegen G.H.D. Rapid determination of benzo(a)pyrene in roasted coffee and coffee brew by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1987b) **35**(4): 545-549.
- De Maria C. A. B., Trugo L. C., et al. Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. *Food Chemistry* (1996) **55**(3): 203-207.
- Del Castillo M. D., Ames J. M., et al. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002) **50**: 3698-3703.
- Dos Santos E. J. et De Oliveira E. Determination of Mineral Nutrients and Toxic Elements in Brazilian Soluble Coffee by ICP-AES. *Journal of Food Composition and Analysis* (2001) **14** (5): 523-531.
- Duarte M. P., Laires A., et al. Genotoxicity of instant coffee : possible involvement of phenolic compounds. *Mutation Research* (1999) **442**: 43-51.
- Esteban-Diez I., Gonzalez A.G., Saenz-Gonzalez C. et Pizarro C. Coffee varietal differentiation based on near infrared spectroscopy. *Talanta* (2006) Sous presse.
- Esteban-Diez I., Gonzalez-Saiz J. M., et al. An evaluation of orthogonal signal correction methods for the characterisation of *arabica* and *robusta* coffee varieties by NIRS. *Analytica Chimica Acta* (2004a) **514**: 57-67.
- Esteban-Diez I., Gonzalez-Saiz J. M., et al. Prediction of sensory properties of espresso from roasted coffee samples by near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* (2004b) **525**: 171-182.
- Farah A., Monteiro M. C., Calado V., Franca A. S. et Trugo L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry* (2005) **98**(2): 373-380.
- Fernandes A. P., Santos M. C., Lemos Sh. G., Ferreira M. M., Nogueira A. R. A. et Nobrega J. A. Pattern recognition applied to mineral characterization of Brazilian coffees and sugar-cane spirits. *Spectrochimica Acta B* (2005) **60**: 717-724.
- Fischer M., Reimann S., et al. Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. *Carbohydrate Research* (2001) **330**: 93-101.
- Franca A. S., Mendonça J. C. F. et Oliveira M. B. P. P. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT* (2005) **38**: 709-715.
- Franca A. S., Oliveira M. B. P. P., Mendonça J. C. F. et Silva X. A. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. *Food Chemistry* (2005) **90**: 89-94.

- Galli V. and Barbas C. Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee. *Journal of Chromatography A* (2004) **1032**: 299-304.
- García-Falcón M. S., Cancho-Grande B. et Simal-Gándara J. Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. *Food Chemistry* (2005) **90**: 643-647
- Giovannucci E. Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. *American Journal of Epidemiology* (1998) **147**: 1043-1052
- Gonzalez A. G., Pablos F., et al. HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. *Food Chemistry* (2001) **73**: 93-101.
- Gross G., Jaccaud E. et Huggett A. C. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. *Food and Chemical Toxicology* (1997) **35**: 547-554.
- Grubben M. J., Boers G. H., et al. Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers : a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* (2000) **71**(2): 480-484.
- Guillen M. D., Sopelana P. et Partearroyo M. A. Study of several aspects of a general method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavouring by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* (2000) **17**: 27-44.
- Guyot B., Lahmy S., et Vincent J.-C. Dosage du 3-4 benzpyrène dans le café torréfié et ses sous-produits de torréfaction. *Café Cacao Thé (Paris)* (1982) **26**(3) : 199-206.
- Guyot G. Torréfaction : mécanismes, transformation physiques et chimiques, Journées du CAFE, CIRAD-CP à Montpellier (1993).
- Hartman T. J., Tangrea J. A., Pietinen P., Malila N., Virtanen M., Taylor PR. et Albanes D. Tea and coffee consumption and risk of colon and rectal cancer in middle aged Finnish men. *Nutrition Cancer* (1998) **31**(1): 41-48.
- Hashim L. et Chaveron H. Use of methylpyrazine ratios to monitor the coffee roasting. *Food Research International* (1996) **28**(6): 619-623.
- Hernandez-Perez J. A. Etude de la torréfaction: modelisation et détermination du degré de torréfaction du café en temps réel, Thèse (2002) Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires.
- Hernandez-Perez J. A., Garcia-Alvarado M. A., Trystram G. et Heyd B. Neural networks for the heat and mass transfer prediction during drying of cassava and mango. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (2004) **5**: 57-64.
- Higdon J. V. et Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Review of Food Science and Nutrition* (2006) **42**(2): 101-123.
- Hiramoto K., Li X., et al. Identification of hydroxyhydroquinone in coffee as a generator of reactive oxygen species that break DNA single strands. *Mutation Research* (1998) **419**: 43-51.
- Hischenhuberg C., et Stijve T. Determination of Benzo(a)pyrene in roasted coffee and coffee brew by HPLC with fluorescence detective. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* (1987) **83**(1): 1-4.

- Hofmann T. A Novel Colored Substructure in Melanoidins Formed by Maillard Reactions of Bound Arginine with Glyoxal and Furan-2-carboxaldehyde. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* (1998) **46**: 3896-3901.
- Huber W. W., McDaniel L. P., et al. Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in the rat. *Mutation Research* (1997) **376**: 115-122.
- Huber W. W., Scharf G., et al. Coffee and its chemopreventive components Kahweol and Cafestol increase the activity of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver - comparison with phase II xenobiotic metabolism. *Mutation Research* (2003) **522**: 57-68.
- Huck C. W., Guggenbichler W., et al. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* (2005) **538**: 195-203.
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 51 (1991) Coffea, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Illy A. et Viani R. Espresso Coffee. Academic press. (1998) San Diego, CA 92101, U.S.
- Inal F. Artificial Neural network predictions of polycyclic aromatic hydrocarbon formation in premixed n-heptane flames. *Fuel Processing Technology* (2006) **87**: 1031-1036.
- Inoue M., Tajima K., Hirose K., Hmajima N., Takezaki T., Kuroishi T., Tominaga S. Tea and coffee consumption and the risk of digestive tract cancers : data from a comparative case-referent study in Japan. *Cancer Causes Control* (1998) **9**: 209-216
- Jham G. N., Velikova R., et al. Lipid classes and triacylglycerols in coffee samples from Brazil : effects of coffee type and drying procedures. *Food Research International* (2001) **34**: 111-115.
- Kark J.D., Friedlander Y., Kaufmann N.A., Stein Y. Coffee, tea and plasma cholesterol : the Jerusalem Lipid Research Clinic prevalence study. *British Medical Journal* (1985) **291**: 699-704.
- Kayali-Sayadi M. N., Rubio-Barroso S., Cuesta-Jimenez M. P. et Polo-Diez L. M. A new method for the determination of selected PAHs in coffee brew samples by HPLC with fluorimetric detection and solid-phase extraction. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology* (1999) **22**(4): 615-627.
- Kemsley E. K., Ruault S., et al. Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant *robusta* beans using infrared spectroscopy. *Food Chemistry* (1995) **54**: 321-326.
- Krejčová A. et Černohorský T. The determination of boron in tea and coffee by ICP-AES method. *Food Chemistry* (2003) **82** (2), 303-308.
- Ky C. L., Louarn J., et al. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry* (2001) **75**: 223-230.
- Lai J. P., Niessner R. et Knopp D. Benzo[a]pyrene imprinted polymers: synthesis,

- characterization and SPE application in water and coffee samples. *Analytica Chimica Acta* (2004) **522**: 137-144.
- Lin D., Tu Y. et Zhu L. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. *Food and Chemical Toxicology* (2004) **43**(1): 41-48.
- Lodovici M., Dolaras P., Casalini C., Ciappellano S. et Testolin G. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. *Food Additives and Contaminants* (1995) **12**(5): 703-713.
- López-Galilea I., Andueza S., et al. Influence of torrefacto roast on antioxidant and pro-oxidant activity of coffee. *Food Chemistry* (2006) **94**: 75-80.
- López-Martinez L., López de Alba P. L., et al. Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. *Analytica Chimica Acta* (2003) **493**: 83-94.
- Mackay D., Shui W.Y. et Mak. C. Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Lewis Publishers, 2, (1992).
- Maier H. G. Teneur en Composés cancérigènes du café en grains *Café Cacao Thé (Paris)*, (1991) **35**(2) :133-142.
- Majer B. J., Hofer E., Cavin C., Lohst E., Uhl M., Glatt H. R., Meinel W. et Knasmüller S. Coffee diterpens prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-nitrosodimethylamine in a human derived liver cell line (HepG2). *Food and Chemical Toxicology* (2005) **43**: 433-441.
- Manzocco L., Calligaris S., Mastrocola D., Nicoli M.C., Lericci C.R. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science and Technology* (1998) **62** : 425-430
- Martin M.J., Pablos F. et Gonzalez A.G. Application of pattern recognition to the discrimination of roasted coffees. *Analytica Chimica Acta* (1996) **320**: 191-197.
- Martin M.J., Pablos F. et Gonzalez A.G. Characterization of *arabica* and *robusta* roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content. *Food Chemistry* (1999) **66**: 365-370.
- Martin M.J., Pablos F. et Gonzalez A.G. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. *Talanta* (1998) **46**: 1259-1264.
- Martin M.J., Pablos F., Gonzalez A.G., Valdenebro M. S. et Leon-Camacho M. Fatty acid profiles as discriminant parameters for coffee varieties differentiation *Talanta*, (2001) **54**: 291-294.
- Mc Grath T., Chan W. G. et Hajaligol M. Low temperature mechanism for the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from the pyrolysis of cellulose. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* (2003) **66**: 51-70.
- Mc Grath T., Sharma R. et Hajaligol M. An experimental investigation into the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from pyrolysis of biomass materials. *Fuel* (2001) **80**: 1787-1797.
- Medoua G. N. et Mbofung C. M. F. Kinetics study of some physico-chemical substances during roasting and preparation of beverage made by *Cassia occidentalis seeds*. *LWT-Food Science and Technology* (2007) sous presse.

- Mendes L. C., De Mendes H. C, Aparecida M. et Da Silva A. P. Optimization of the roasting of robusta (*C. canephora conillo*) using acceptability test and rsm. *Food Quality and Preference* (2001) **12**: 153-162.
- Michaud DS., Giovannucci E., et al. Coffee and alcohol consumption and the risk of pancreatic cancer in two prospective United States cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2001) **10**(5): 429-437.
- Montavon Ph., Duruz E., Rumo G. et Pratz G. Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003) **51**: 2328-2334.
- Morales F. J. Assessing the non-specific hydroxyl radical scavenging properties of melanoidins in a Fenton-type reaction system. *Analytica Chimica Acta* (2005) **534**: 171-176.
- Moret S. et Conte L.S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils. *Journal of Chromatography A* (2000) **882** (1-2): 245-253.
- Mukamal K. J., Maclure M., Muller J. E., Sherwood J. B. et Mittleman M. A. Caffeinated coffee consumption and mortality after acute myocardial infarction. *American Heart Journal* (2004) **147** (6): 999-1004.
- Nam J. J. et Lee S. H. GC-MS/MS analysis of benzo[a]pyrene by ion trap tandem mass spectrometry. *Bulletin of Korean Chemical Society* (2002) **23**(8): 1097-1102.
- Navarini L., Gilli R., et al. Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans : isolation and characterization. *Carbohydrate Polymers* (1999) **40**: 71-81.
- Nehlig A. et Debry G. Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffee : A review. *Mutation Research* (1994) **317**(2): 145-162.
- Nikolova-Damyanova B., Velikova R. et Jham G. N. Lipid classes, fatty acid composition and triacylglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil. *Food Research International*, (1998) **31**(6-7): 479-486.
- Nunes F. M. et Coimbra M. A. Chemical characterization of galactomannans and arabinogalactans from two arabica coffee infusions as affected by the degree of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002a) **50**: 1429-1434.
- Nunes F. M. et Coimbra M. A. Chemical characterization of the high-molecular-weight material extracted with hot water from green and roasted robusta coffees as affected by the degree of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002b) **50**: 7046-7052.
- Nunes F. M., Domingues M. R., et al. Arabinosyl and glucosyl residues as structural features of acetylated galactomannans from green and roasted coffee infusions. *Carbohydrate Research* (2005) **340**: 1689-1698.
- Nyman P. J., Perfett G. A., Joe F. L., JR. et Diachenko G. W. Comparison of two clean-up methodologies for the gas chromatographic/mass spectrometric determination of low nanogram/gram levels of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood. *Food Additives and Contaminants* (1993) **10**(5): 489-501.
- Ogawa M., Kamiya C., Iida Y. Contents of tocopherols in coffee beans, coffee infusions and instant coffee. *Nippon Shokuhin Gakkaishi* (1989) **36**: 490-494.
- Oliveira M. B. P. P., Franca A. S., Gloria M. B. A. et Borges M. L. A. The effect of roasting

- on the presence of bioactive amines in coffees of different qualities. *Food Chemistry* (2005) **90**: 287-291.
- Olthof M. R., Hollman P. C., et al. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* (2001) **73**: 532-538.
- Oosterveld A., Harmsen J. S., Voragen A. G. J. et Schols H. A. Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. *Carbohydrate Polymers* (2003) **52**: 285-269.
- Oosterveld A., Voragen A.G. J., Schols H. A. Effect of roasting on the carbohydrate composition of *Coffea arabica* beans. *Carbohydrate Polymers* (2003)**54**: 183-192.
- Parras P., Martinez-Tomé M., et al. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry* (2006) sous presse.
- Philips D.H., Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research* (1999), 443: 139-147.
- Pietinen P., Aro A., Tuomilehto J., Uusitalo U., Korhonen H. Consumption of boiled coffee is correlated with serum cholesterol in Finland. *International Journal of Epidemiology* (1990) 19(3): 586-590.
- Pittia P., Dalla Rosa M. et Lerici C. R. Textural changes of coffee beans as affected by roasting conditions *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, (2001) **34**: 168-175.
- Pyle S. M., Betowski L. D., Marcus A. B. et Winnik W. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons by Ion Trap tandem Mass Spectrometry. *Journal of American Society for Mass Spectrometry* (1997) **8**: 183-190.
- Raemy A. Differential thermal analysis and heat flow calorimetry of coffee and chicory products. *Thermochimica Acta* (1981) **43**: 229-236.
- Raemy A. et Lambelet P. A calorimetric study of self-heating in coffee and chicory. *Journal of Food Technology* (1982) **17**: 451-460.
- Ramesh K. Sharmaa, Chana W. G, Seemanb J. I. Et Hajaligola M. R. Formation of low molecular weight heterocycles and polycyclic aromatic compounds (PACs) in the pyrolysis of α -amino acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* (2003) 66: 97-121.
- Ratnayake W.M.N., Hollywood R., O'Grady E., Stavric B. Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods. *Food and Chemical Toxicology* (1993) **31**: 263-269.
- Ratnayake W. M. N., Pelletier G., Hollywood R., Malcolm S. et Stavric B. Investigation of the effect of coffee lipids on serum cholesterol in hamsters. *Food Chemistry* (1995) **3**: 195-201.
- Redgwell R. J., Schmitt C., et al. Hydrocolloids from coffee : physicochemical and functional properties of an arabinogalactan-protein fraction from green beans. *Food Hydrocolloids* (2005) **19**: 1001-1015.
- Redgwell R. J., Trovato V., Curti D. et Fischer M. Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. *Carbohydrate Research* (2002) **337**: 421-431.

- Reh C. T., Gerber A., et al. Water content determination in green coffee - Method comparison to study specificity and accuracy. *Food Chemistry* (2006) **96**: 423-430.
- Ruschenburg U., et Jahr D. Teneurs en Benzo-a-pyrène du café et de certains autres produits alimentaires. *Café Cacao Thé (Paris)* (1986) 30(1) : 7-10.
- Ryan D., Shellie R., et al. Analysis of roasted coffee bean volatiles by using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* (2004) **1054**: 57-65.
- Saltor M, Duplatre A, Boatella J. Identification of coffee species on the basis of sterols. *Ann Bromatol* (1989) **41**: 1-8.
- Saroja M., Balasenthil S., et al. Coffee enhances the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced hamster buccal pouch carcinomas. *Oral Oncology* (2001) **37**: 172-176.
- Sarrazin C., Le Quéré J. L., et al. Representativeness of coffee aroma extracts : a comparison of different extraction methods. *Food Chemistry* (2000) **70**: 99-106.
- Schwartzberg H. G. Engineering and Food for the 21st Century : Chapter Modelling bean heating during batch roasting of coffee beans. CRC Press LLC. (2002) London, New York, Boca Raton.
- Sharma R. et Hajaligol M. Effect of pyrolysis conditions on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from polyphenolic compounds. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* (2003) **66**: 123-144.
- Sharma R. K., Chan W. G. et Hajaligol M. R. Product compositions from pyrolysis of some aliphatic α -amino acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* (2006) **75**: 69-81.
- Sharma R., Chan W. G., Seeman J. I. et Hajaligol M. Formation of low molecular weight heterocycles and polycyclic aromatic compounds (PACs) in the pyrolysis of α -amino acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* (2003) **66**: 97-121.
- Shin E-J., Nimlos M. R. et Evans R. J. The formation of aromatics from the gas-phase pyrolysis of stigmasterol: kinetics. *Fuel* (2001) **80**: 1681-1687.
- Smith A. W. Introduction. In : RJ Clarke, R Macrae Eds. Coffee. Vol 1:1. Chemistry, Elsevier Applied Science Publ. (1985): 1-41 London.
- Smith R. F. A history of coffee. In coffee, Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverages. Ed : M.N. CLIFFORD, K. C. WILSON. Avi Publ. Comp. (1985) pp: 1-12 Westport.
- Tavani A., Pregnolato A., La Vecchia C., Negri E., Talamini R., Franceschi S. Coffee and tea intake and risk of cancers of the colon and rectum: a study of 3,530 cases and 7,057 controls. *International Journal of Cancer* (1997) **73**: 193-197.
- Tavani A. et La Vecchia C. Coffee and cancer: a review of epidemiological studies, 1990-1999. *European Journal of Cancer Prevention* (2000) **9**(4): 241-256.
- Tavani A., Bertuzzi M., et al. Coffee and tea intake and risk of oral, pharyngeal and oesophageal cancer. *Oral Oncology* (2003) **39**: 695-700.
- Turrio-Baldassarri L., Battistelli Ch. L. et Iamicelli A. L. Evaluation of the efficiency of extraction of PAHs from diesel particulate matter with pressurized solvents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2003) **375**: 589-595.

- Urgert R., Van der Weg G., Kosmeijer-Schuil T.G., Van Bovenkamp P., Hovenier R., Katan M.B. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1995) **43**: 2167-2172
- Urgert R., Katan M.B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. *Annual Review of Nutrition* (1997) **17** : 305-324.
- Valdovinos Tijerino B. O. Etude de la torréfaction du café: Modélisation et développement des outils pour maîtriser la qualité du produit en ligne, Thèse (2005) Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires.
- Van Dam R. M. et Feskens E. J. M. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *The Lancet* (2002) **360** (9344): 1477-1478.
- Van Der Stegen GHD, Van Duijnn J. Analysis of normal acids in coffee. In: 12^e Colloque Scientifique International sur le café, Montreux, 1987. Association Scientifique Internationale du café, (1988) : 238-246 Paris.
- Van Dusseldorp M., Katan M.B., Van Vliet T., Demacker P.N.M., Stalenhoef A.F.H. Cholesterol-raising factor from boiled coffee does not pass a paper filter. *Arteriosclerosis and Thrombosis* (1991) **11**: 586-593.
- Vanier M. Les cafés précieux. Robert Laffont (1983).
- Vasconcelos A. L. S., Franca A. S., et al. A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans. *Food Chemistry* (2007) **101**: 26-32.
- Viani R. The composition of coffee. In: S. Garattini Ed. Caffeine, Coffee and Health. Raven Press (1993):17-41 New York.
- Viani R. Coffee. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1986) A7, 315-339.
- Wang G., Lee A. S., Lewis M., Kamath B. et Archer R. K. Accelerated Solvent Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Smoked Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1999) **47**: 1062-1066.
- Wang S. F., Liu B. Z., Sun K. J. et Su Q. D. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons formed during pyrolysis of phenylalanine. *Journal of Chromatography A* (2004) **1025**: 255-261.
- Watanabe K. H., Lin H. I., Bart Jr H. L., Martinat P., Means J. C., Kunas M. L. et Grimm D. A. Bayesian estimation of kinetic rate constants in a food-web model of polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulation. *Ecological Modelling* (2005) **181**: 229-246.
- Weusten-Van der Wouw M.P.M.E., Katan M.B., Viani R., Huggett A.C., Liardon R., Lund-Larsen P.G., Thelle D.S., Ahola I., Aro A., Meyboom S., Beynen A.C. Identity of the cholesterol-raising factor from boiled coffee and its effects on liver function enzymes. *Journal of Lipid Research* (1993) **35**: 721-733
- Woolcoot C. G., King W. D., et al. Coffee and tea consumption and cancers of the bladder, colon and rectum. *European Journal of Cancer* (2002) **11**(2): 137-145.
- Wu X., Skog K. et Jagerstad M. Trigonelline, a naturally occurring constituent of green coffee beans behind the mutagenic activity of roasted coffee ? *Mutation Research* (1997) **391**: 171-177.
- Yusa V., Pardo O., et al. Application of accelerated solvent extraction followed by gel

performance chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel tissue. *Food Additives and Contaminants* (2005) **22**(5): 482-489.

Zambonin C. G., Balest L., De Benedetto G. E. et Palmisano F. Solid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis for the characterization of roasted coffee. *Talanta* (2005) **66**: 261-265.

ANNEXES

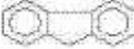
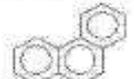
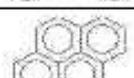
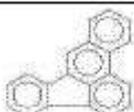
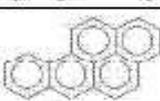
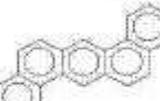
ANNEXE 1 : Les composés volatils extraits du café torréfié par HS-SPME

Familles	Composés
Furanes	2-Méthylfurane
	2-Ethylfurane
	2-Méthoxy-méthylfurane
	2,5-Diméthylfurane
	2-Furanméthanol
	2-2'-Ossibis(méthylène)bisfurane
	2-Vinyl-5-méthylfurane
2-Acétylefurane	
Pyrroles	1 <i>H</i> -Pyrrole
	1-Méthyl-1 <i>H</i> -pyrrole
	Acétyl pyrrole
	1-(2-Furanyl-méthyl)-1 <i>H</i> -pyrrole
	1 <i>H</i> -Pyrrole-2-carboxaldéhyde
	1-(2-Furanyl-méthyl)-1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxaldéhyde
	1-(1 <i>H</i> -pyrrole-2-yl)-éthanone
1-(1 <i>H</i> -pyrrole-1-yl)-2-propanone	
Pyrazines	Pyrazine
	Ethylpyrazine
	2-Méthylpyrazine
	2,3-Diméthylpyrazine
	2,5-Diméthylpyrazine
	2,6-Diméthylpyrazine
	2-Ethyl-6-méthylpyrazine
	2-Ethyl-5-méthylpyrazine
	2-Ethyl-3-méthylpyrazine
	Propylpyrazine
	2,6-Diéthylpyrazine
	3-Ethyl-2,5-diméthylpyrazine
	2-Ethyl-3,5-diméthylpyrazine
	Triméthylpyrazine
2-Méthyl-5-vinylpyrazine	
Acétylpyrazine	
2-Acétyl-3-méthylpyrazine	
Pyridines	Pyridine
	Ethylpyridine
	Hydroxypyridine
Aldéhydes	2-Méthylpropanal
	2-Oxopropanal
	2-Méthylbutanal
	3-Méthylbutanal
	2-Furancarboxaldéhyde
5-Méthyl-2-furancarboxaldéhyde	
Cétones	Propane-2-one
	Hexane-3-one
	3,3-Diméthylbutanone
	2,3-Butanedione
	2,3-Pentanedione
2,3-Hexanedione	

	3,4-Hexanedione
	3-Hydroxy-2-butanone
	1-Hydroxy-2-butanone
	1-(Acétyloxy)-2-butanone
	1-(Acétyloxy)-2-propanone
	1-Hydroxy-2-propanone
	1-(2-Furyl)-2-propanone
	1-(2-Furyl)-éthanone
	3(2 <i>H</i>)-furanone
	Dihydro-2-méthyl-3(2 <i>H</i>)-furanone
	Dihydro-2-méthyl-3(2 <i>H</i>)-furanone
	4-Hydroxy-2,5-diméthyl-3(2 <i>H</i>)-furanone
	2-Méthyl-3(2 <i>H</i>)-furanone
	2,5-Diméthyl-3(2 <i>H</i>)-furanone
	5-Méthyl-2(3 <i>H</i>)-furanone
	Dihydro-2(3 <i>H</i>)-furanone
	Dihydro-3-méthylène-2(3 <i>H</i>)-furanone
	2,4,5-Triméthyl-3(2 <i>H</i>)-furanone
	Cyclopentanone
	2-Méthyl-2-cyclopenten-1-one
	1-Hydroxy-3-méthyl-2-cyclopentanone
	2-Hydroxy-3-méthyl-2-cyclopenten-1-one
	3-Ethyl-2-hydroxy-2-cyclopenten-1-one
	2,3-Dihydro-5-hydroxy-6-méthyl-4 <i>H</i> -pyran-4-one
	3-Hydroxy-2-méthyl-4 <i>H</i> -pyran-4-one
	1-(5-Méthyl-2-furanyl)-1,2-propanedione
Phénols	Méthylphénol
	4-Méthoxyphénol
	2-Méthoxyphénol
	Phénol
	4-Ethyl-2-méthoxyphénol
Composés soufrés	2-Furanméthanethiol
	2-((Méthylthio)méthyl)furane
	3-Mercapto-3-méthyl-2-butanol
	Diméthyldisulfure
	Diméthylsulfure
	Ethanethiol
	Thiophène
	Sulfure de carbone
Divers	4-Méthylpyrimidine
	4,6-Diméthylpyrimidine
	4,5-Diméthylpyrimidine
	Ethanediol diacétate
	Ethanediol propanoate
	2-Furan-méthanol acétate
	3-Furan-méthanol acétate
	Furfuryl formate
	Furfuryl acétate
	Méthyl hexadécanoate
	2-Propanamine
	2,4,6-Triméthyl-3-benzènediamine
	Limonène
	Myrcène
	Acide acétique
	Acide 3-méthylbutyrique

ANNEXE 2 : Structures chimiques et propriétés des 16 HAP classés polluants prioritaires par l'US EPA (selon Mackay et al., 1992)

Note : Valeurs de solubilité données à 20°C

Composé	Formule semi développée	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité dans l'eau S _w (mg.L ⁻¹)	Coefficient de partage octanol/eau log K _{ow}	Pression de vapeur (Pa)
Naphtalène		C ₈ H ₁₀	128,2	31	3,37	36,8
Acenaphthylène		C ₁₂ H ₈	150,2	16,1	4	4,14
Acénaphthène		C ₁₂ H ₁₀	154,2	3,8	3,92	1,52
Fluorène		C ₁₃ H ₁₀	166,2	1,9	4,18	0,715
Phénanthrène		C ₁₄ H ₁₀	178,2	1,10	4,57	0,113
Anthracène		C ₁₄ H ₁₀	178,2	0,045	4,54	0,0778
Fluoranthène		C ₁₆ H ₁₀	202,3	0,26	5,22	8,72 10 ⁻³
Pyrène		C ₁₆ H ₁₀	202,3	0,132	5,18	0,0119
Benzo[a]anthracène		C ₁₈ H ₁₂	228,3	0,011	5,91	6,06 10 ⁻⁴
Chrysène		C ₁₈ H ₁₂	228,3	0,002	5,6	8,4 10 ⁻⁷
Benzo[b]fluoranthène		C ₂₀ H ₁₂	252,3	0,0015	5,8	6,7 10 ⁻⁵
Benzo[k]fluoranthène		C ₂₀ H ₁₂	252,3	0,0008	6	4,12 10 ⁻⁶
Benzo[a]pyrène		C ₂₀ H ₁₂	252,3	0,0038	6,04	2,13 10 ⁻⁵
Dibenzo[a,h]anthracène		C ₂₂ H ₁₄	278,3	0,0006	6,75	9,16 10 ⁻⁸

ANNEXE 3 : Les HAP et leur toxicité

Les effets toxiques généraux sont évalués par le biais d'essais après administration répétée de la substance étudiée, pendant trois mois à deux ans pour identifier les effets chroniques, pendant un à cinq jours le plus souvent pour étudier les effets à court terme. Les effets toxiques spéciaux (apparition d'effets mutagènes, cancérigènes, immunotoxiques ou tératogènes) font pour leur part appel à des méthodes expérimentales standardisées dans le cadre de bonnes pratiques de laboratoire, qui sont des recommandations de l'organisation de coopération et de développement Economique (OCDE) relatives à la réalisation d'essais toxicologiques ayant valeur de normes internationales.

Ces études permettent donc de déterminer, d'une part une dose sans effet (DSE) n'induisant aucun effet toxique ou pharmacologique, et d'autre part la dose journalière admissible (DJA) pour l'homme. Dans le cas des toxiques potentiellement présents dans les aliments, cette DJA correspond à la valeur maximale de résidus susceptible d'être ingéré quotidiennement sans risque pour le consommateur (exprimée en mg ou µg/kg de poids vif/jour).

En général les tests de toxicité sont effectués sur des animaux ou des micro-organismes aquatiques ou terrestres ; cela pose donc un problème d'extrapolation et d'évaluation de la toxicité des HAP pour l'homme. On a également des tests d'écotoxicologie qui permettent de caractériser un niveau de toxicité des polluants présents dans les milieux aquatiques et terrestres. Différents tests sont utilisés en laboratoire, et l'un des plus sensibles et des plus rapides à mettre en oeuvre pour les HAP est le test Microtox, qui repose sur l'extinction de luminescence de la bactérie *Vibrio fischeri*. Ce test permet de déterminer la concentration de polluant nécessaire pour diminuer de moitié la luminescence initiale de la bactérie. La toxicité d'une molécule est différente lorsqu'elle est seule ou en mélange. Par exemple, Renoux *et al.* (1999) reportent une toxicité plus élevée du fluorène lorsqu'il est en mélange avec du phénanthrène et du *p*-crésol ; cela montre qu'il existe des effets de synergie entre les molécules.

La toxicité des HAP dépend de leur capacité à pénétrer dans l'environnement ou dans l'organisme en une quantité ou concentration de manière à avoir immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou l'organisme ou constituer un danger pour la vie ou la santé humaine. Elle dépend également du nombre de cycles benzéniques contenus dans la molécule. Développons plus en détail la toxicité de certains HAP soumis à notre étude.

1. Toxicité des HAP

○ L'acénaphène

L'acénaphène n'a pas été reconnu comme cancérigène par les différents organismes (Union Européenne, CIRC et US EPA) et n'est pas génotoxique. Aucune exposition aiguë à l'acénaphène n'a été faite sur l'homme à cause de son odeur. L'exposition chronique à l'acénaphène induit des troubles hépatiques, rénaux et hématologiques chez les animaux ; il n'existe pour le moment pas de données concernant ce type de toxicité chez l'homme. Certaines données d'écotoxicité aiguë et chronique sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Valeurs d'écotoxicité aiguë et chronique pour différentes espèces de la faune et de la flore envers l'acénaphène.

Organisme	Ecotoxicité	Espèce	Critère d'effet	Valeur (mg/L)	Références
Micro-crustacés	aiguë	<i>Daphnia magna</i>	CE50 (48 h)	0,32	Vindimian, 2000
		<i>Daphnia magna</i>	CE50 (48 h)	0,12	
Algues	Chronique	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	NOEC (72 h)	0,037	Vindimian, 2000
Crustacés		<i>Ceriodaphnia dubia</i>	NOEC (7 j)	0,042	Thursby et al., 1989
		<i>Mysidopsis bahia</i>	NOEC	0,044	

CL50 : Concentration létale pour 50% des organismes, CE50 : Concentration effective à 50%, c'est-à-dire affectant 50% de la population testée, NOEC : Concentration pour laquelle aucun effet n'est observé

○ Le fluorène

Classé parmi les 16 HAP de l'US EPA, le fluorène n'a pas été identifié comme carcinogène pour l'homme par les différents organismes (Union Européenne, CIRC et US EPA), et n'est pas également génotoxique. Chez l'animal, l'exposition aiguë au fluorène induit principalement des troubles hépatiques, mais il n'existe pas de données concernant ce type de toxicité chez l'homme. Il en est de même pour la toxicité chronique. En ce qui concerne toujours les animaux, d'autres troubles hématologiques viennent s'ajouter aux troubles hépatiques. Des valeurs d'écotoxicité aiguë et chronique sont consignées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Valeur d'écotoxicité aiguë et chronique pour diverses espèces envers le fluorène

Organisme	Ecotoxicité	Espèce	Critère d'effet	Valeur (µg/L)	Références
Micro-crustacés	Aiguë	<i>Daphnia magna</i>	CL50 (24 h)	407	Vindimian, 2000
		<i>Daphnia magna</i>	CL50 (48 h)	408	
Algues	Chronique	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE10 (72h)	82	
Micro-crustacés		<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE10 (7j)	25	

CL50 : Concentration létale pour 50 % des organismes,
CE10 : concentration effective à 10 %, c'est à dire affectant 10 % de la population testée.

○ *Le phénanthrène*

Il fait partir des 16 HAP reconnus par l'US EPA et n'est pas considéré comme agent cancérigène pour l'homme (Union européenne, USEPA et CIRC). L'exposition chronique au phénanthrène chez les animaux a montré que l'oxydation de ce composé dans les microsomes de foie de rats entraîne, en faible quantité, la formation d'un composé potentiellement cancérigène, le 1,2-diol-3,4-époxyde. Cependant, l'effet cancérigène du phénanthrène semble encore discutable [Jacob et al. (1982)]. Chez l'homme, aucune donnée concernant l'effet induit par une exposition aiguë ou chronique n'est disponible. En revanche, de nombreuses données écotoxicologiques sont données dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Valeur d'écotoxicité aiguë et chronique pour divers organismes envers le phénanthrène.

Organisme	Ecotoxicité	Espèce	D/M	Critère d'effet	Valeur (mg/L)	Références
Algues et macrophytes	Aiguë	<i>Selenastrum capricornutum</i>	D	CE50 (4h)	0,94	Millemann et al., 1984
Invertébrés		<i>Daphnia magna</i>	D	CE50 (48 h)	0,35	Edsall, 1991
Algues	Chronique	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		NOEC (72 h)	0,0264	Vindimian, 2000
Micro-crustacés		<i>Daphnia magna</i>		NOEC (21 j)	0,021	Hoofman et Evers-de Ruyter, 1992a

D : organisme d'eau douce ; *M* : organisme marin.

○ *L'anthracène*

L'USEPA et le CIRC le classent comme agent non cancérigène (groupe 3) et son caractère génotoxique n'a pas fait l'objet d'examen par l'Union Européenne. C'est un irritant de la peau, des yeux, des muqueuses et du tractus respiratoire.

Dans le cas de l'étude de la toxicité chronique chez l'homme, trois cas d'épithéliomes de la main, de la joue et du poignet ont été observés après de longues années d'exposition chronique à l'anthracène non raffiné. Ces effets n'ont pas été observés dans le cas d'une exposition chronique à l'anthracène purifié [Kennaway (1924)]. Par contre chez les animaux, une injection sous cutanée d'anthracène induit un dépôt de fer dans les ganglions lymphatiques et une diminution du nombre de cellules lymphoïdes [Hoch-Ligeti (1941)]. Une co-exposition cutanée à l'anthracène et aux rayonnements ultra-violets induit des tumeurs cutanées du type carcinome et certaines sont métastasées [Heller, 1950]. Aussi, une co-exposition avec du benzo[a]pyrène, induit la formation d'un papillome. L'anthracène est une substance qui présente une toxicité plus importante en présence de rayonnement ultraviolet.

Des tests réalisés sur diverses espèces de la faune et de la flore ont permis de disposer de données d'écotoxicité aiguë et chronique consignées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Valeurs d'écotoxicité aiguë et chronique pour divers organismes envers l'anthracène.

Organisme	Ecotoxicité	Espèce	Critère d'effet	Valeur ($\mu\text{g/L}$)	Références
Algues	Aiguë	<i>Selenastrum capricornutum</i>	CE50	16,1	Gala et Giesy, 1994
Invertébrés		<i>Daphnia magna</i>	CL50 (48h)	95	Munoz et Tarazona, 1993
Algues	Chronique	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE10 (72h)	7,8	Vindimian, 2000
Crustacés		<i>Daphnia magna</i>	NOEC (21j)	2,1	Foran et al., 1991

○ Le fluoranthène

Le fluoranthène est classé comme agent non carcinogène pour l'homme (groupe 3) et aucune conclusion n'a pu être émise concernant la génotoxicité du fluoranthène [US EPA (IRIS), (1990)]. Par contre, sa toxicité croît par l'irradiation UV [Rababah et Maturawa (2002) ; Hatch et Burton (1999)].

Chez les animaux, il n'y a pas assez d'études faites sur la toxicité aiguë quelle que soit la voie d'exposition. Pour la voie orale, une DL50 de 2000 mg.kg⁻¹ de poids corporel a été calculée chez le rat, alors qu'une DL50 de 3180 mg.kg⁻¹ de poids corporel est estimée chez le lapin après une exposition par voie cutanée [Smyth *et al.* (1962)]. Leur exposition aiguë par gavage au fluoranthène induit une modification significative du comportement incluant une ataxie et une diminution de la réponse à un stimulant sensoriel [Saunders et al. (2003)].

Chez l'homme, l'étude faite met en évidence l'effet induit par une exposition par voie pulmonaire au fluoranthène. Dans cette étude, les salariés ont été exposés par voie pulmonaire à un mélange de HAP contenant du fluoranthène, du perylène, du pyrène, du benzo[a]pyrène, du chrysène, du benzo[a]anthracène, du dibenzo[a,h]anthracène et du benzo[g,h,i]perylène. L'exposition à de fortes concentrations de ce mélange induit une diminution du taux d'immunoglobulines sériques (IgA, IgG et IgM). Néanmoins cette étude n'a pas permis d'identifier l'effet spécifique du fluoranthène [INERIS (2003)].

Chez l'animal, aucune étude n'est disponible concernant l'effet induit par une exposition chronique au fluoranthène. En revanche, de nombreuses données écotoxicologiques sont disponibles dans la littérature. Dans le **Tableau 5** sont consignées différentes valeurs d'écotoxicité aiguë et chronique.

Tableau 5 : Valeurs d'écotoxicité aiguë et chronique pour divers organismes envers le fluoranthène.

Organisme	Ecotoxicité	Espèce	Critère d'effet	Valeur (mg/L)	Références
Algues	Aiguë	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	NOEC (72h)	0,0086	Vindimian, 2000
Micro-crustacés		<i>Daphnia magna (D)</i>	NOEC (21 j)	0,017	Spehar et al., 1999
Algues	Chronique	<i>Pseudokirchneriella subcapitata (D)</i>	NOEC (72 h)	0,0086	Vindimian, 2000
Micro-crustacés		<i>Daphnia magna (D)</i>	NOEC (21 j)	0,017	Spehar et al., 1999

D : organisme d'eau douce

○ Le pyrène

Le pyrène est classé comme agent non cancérigène par l'US EPA et les autres organismes de référence, et sa génotoxicité n'a pas fait l'objet d'examen par l'Union Européenne. En toxicité aiguë et chronique, il n'existe pas de donnée disponible concernant l'étude chez l'homme. Les études mises en oeuvre ont été réalisées sur des mélanges et, bien qu'induisant des effets cancérigènes, elles n'ont donc pas pu mettre en évidence le caractère toxique du pyrène seul. En présence d'un rayonnement UV (UV-A = 70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) une augmentation de la toxicité du pyrène se produit [Weinstein et Polk (2001)].

Chez les animaux, après une exposition aiguë au pyrène en solution dans l'éthanol sur des cobayes, une importante réaction phototoxique est observée après exposition aux UV-A à 320-440 nm [Kochevar et al. (1982)]. L'exposition chronique par gavage au pyrène produit des néphropathies caractérisées par la présence de régénérations tubulaires rénales multifocales accompagnées souvent par une infiltration lymphocytaire interstitielle et/ou une fibrose interstitielle localisée, des lésions rénales, des augmentations de la taille du foie et des changements hématologiques [RAIS (1993)].

Des chercheurs évaluant la toxicité de la molécule confirment que le pyrène n'est pas un carcinogène humain, mais il est par contre classé comme tératogène. D'autres voies d'exposition (dermique, subcutanée) fournissent en général des résultats négatifs [RAIS (1993)]. D'autres tests ont été effectués sur des animaux donnant ainsi une DL50 de 2700 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ chez le rat à la suite d'une ingestion orale, et une DL50 de 170 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ par inhalation. Des données d'écotoxicité aiguë et chronique sont consignées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Valeurs d'écotoxicité aiguë et chronique pour divers organismes envers le pyrène.

Organisme	Ecotoxicité	Espèce	Critère d'effet	Valeur (mg/L)	Références
Micro-crustacés	Aiguë	<i>Daphnia magna</i>	CL50 (24 h)	165	Vindimian et al., 2000
Algues	Chronique	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE10 (72 h)	1,2	Vindimian et al., 2000
Micro-crustacés		<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE10 (7 j)	2,1	

○ Le chrysène

Classé parmi les 16 HAP par l'US EPA, le chrysène est répertorié comme substance cancérigène pour l'homme par les différents organismes [Union Européenne (2ème catégorie) CIRC (groupe 3), US EPA (groupe B2)] et est génotoxique car substance préoccupante pour l'homme en raison d'effets mutagènes. Chez l'homme, l'effet induit par une exposition aiguë au chrysène n'est pas disponible. En revanche, chez les animaux, une exposition aiguë par voie orale a entraîné une induction de l'activité aldéhyde déshydrogénase et une augmentation significative du poids du foie [Gershbein (1975)]. Chez les animaux, une exposition chronique par voie intra-péritonéale de chrysène induit une augmentation de l'incidence des tumeurs hépatiques, des adénomes et des carcinomes du foie. En revanche, une exposition chronique par voie cutanée de chrysène induit des tumeurs de la peau. Le chrysène a également entraîné des effets embryotoxiques et tératogènes chez les jeunes canards [Hoffmann et Gay (1981)].

Les résultats d'écotoxicité sont très peu nombreux dans la littérature scientifique. Quelques résultats d'essai aiguë en milieu aquatique sont disponibles et consignés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Valeurs d'écotoxicité aiguë pour des organismes envers le chrysène.

Organisme	Ecotoxicité	Espèce	Critère d'effet	Valeur	Références
Algues	Aiguë	<i>Anabaena flosaquae (D)</i>	CL50 (2 h)	61 nmol/L	Bastian et Toetz, 1985
Organismes benthiques		<i>Lemna gibba(D)</i>	CL50 (8 j)	2000 µg/L	Huang et al., 1997

○ Le benzo[b]fluoranthène

Faisant partie des 16 HAP de l'US EPA, le benzo[b]fluoranthène est assimilé à des substances cancérigènes pour l'homme (selon l'Union Européenne), classé en groupe 2B (pourrait être cancérigène pour l'homme) par le CIRC, et en classe B2 (probablement cancérigène) par l'US EPA. Chez l'homme, aucune donnée en exposition aiguë et chronique n'est disponible. Son

caractère génotoxique n'est pas reconnu par l'Union Européenne [JOCE (2000)]. Par contre, il a induit des détériorations génétiques chez les procaryotes [Amin et al. (1982)], les eucaryotes et les cellules mammaires. En étude chronique chez l'animal, le benzo[b]fluoranthène par voie cutanée induit une augmentation significative des papillomes et des carcinomes à partir de 3,4 µg [Habs et al. (1980)] ; la plus faible dose pouvant induire le développement de tumeurs malignes est de 0.1% soit 1,2 mg/kg/j ce qui stipule que l'augmentation des tumeurs est dose-dépendante. Il existe peu de données d'écotoxicité disponibles dans la littérature. Certaines données obtenues en milieu aquatique sont consignées dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Valeurs d'écotoxicité aiguë et chronique en milieu aquatique envers le benzo[b]fluoranthène.

Organisme	Ecotoxicité	Espèce	Critère d'effet	Valeur (µg/L)	Références
Micro-crustacés	Aiguë	<i>Daphnia magna</i>	CL50 (48 h)	> 1,1	Vindimian et al., 2000
Algues	Chronique	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE10 (72 h)	> 1	Vindimian et al., 2000
Micro-crustacés	Chronique	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE10 (7 j)	> 1	Vindimian et al., 2000

○ Le benzo[k]fluoranthène

Le benzo[k]fluoranthène faisant partie de la liste des HAP de l'US EPA, est assimilé à une substance pouvant être cancérigène pour l'homme selon l'Union Européenne ; il est classé dans le groupe 2B par le CIRC, et dans la classe B2 par l'USEPA. Il n'est pas génotoxique selon l'Union Européenne mais peut induire des mutations chez certaines cellules (*S. typhimurim*) en présence d'activateur [Amin et al. (1985) ; Weyand et al. (1988)]. Chez l'homme, aucun effet défavorable n'a été observé par une exposition aiguë. Chez l'animal, l'exposition aiguë au mélange de composés suivants (benzo[k]fluoranthène, dibenzo[a,h]anthracène, benzo[a]anthracène, benzo[b]naphthol[2,3-d]thiophène) et d'autres HAP sur les embryons de poulets [Brunstrom et al. (1991)] a permis de calculer la DL50 de 4 toxiques (benzo[k]fluoranthène, dibenzo[ah]anthracène, benzo[a]anthracène, benzo[b]naphthol[2,3-d]thiophène) et la DL50 du benzo[k]fluoranthène (56 nmol/kg œuf). Cela a révélé que le benzo[k]fluoranthène est 3 à 6 fois plus toxique que les trois autres composés. Par contre l'exposition chronique à 0,5% de benzo[k]fluoranthène par voie cutanée chez des souris a permis d'observer le développement de papillomes cutanées chez 2 souris (sur 20). La réponse immunotoxique observée en présence d'un mélange de HAP est due à

l'effet induit par les HAP à 4 cycles ou plus. Certaines données d'écotoxicité aiguë et chronique sont consignées dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Valeurs d'écotoxicité aiguë et chronique de certains organismes aquatiques envers le benzo[k]fluoranthène.

Organisme	Ecotoxicité	Espèce	Critère d'effet	Valeur (µg/L)	Référence
Micro-crustacés	Aiguë	<i>Daphnia magna</i>	CL50 (48 h)	> 1,1	Vindimian et al., 2000
	Chronique	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE10 (7 j)	> 1,1	

O Le benzo[a]pyrène

Le benzo[a]pyrène faisant partie des 16 HAP de l'US EPA (classe B2), est reconnu comme étant le plus toxique ; il constitue dès lors une molécule de référence du point de vue de la toxicité. Substance cancérigène pour l'homme, il est de catégorie 2 selon l'Union Européenne et du groupe 2A selon le CIRC. Il est reconnu génotoxique par l'Union Européenne car substance mutagène pour l'homme. Chez l'homme, l'exposition aiguë au benzo[a]pyrène n'a pas fait l'objet d'étude ; par contre son exposition chronique par voie cutanée a induit des effets cutanés à type d'exacerbations de lésions préexistantes chez des patients porteurs de pemphigus ou de xeroderma pigmentosum. Chez l'animal, le benzo[a]pyrène induit des tumeurs par trois voies d'exposition possibles : pulmonaire, orale et cutanée. Par voie orale (chez des souris), il induit des papillomes et des carcinomes des cellules squameuses gastriques et une augmentation de l'incidence des adénomes pulmonaires et des leucémies [Rigdon et Neal (1966)]. Chez le rat l'exposition répétée à 0,15 mg/kg de benzo[a]pyrène induit des tumeurs de l'estomac, de l'œsophage et du larynx [Brune et al. (1981)]. Par inhalation, il induit chez le hamster des tumeurs de la cavité nasale, du pharynx, du larynx et de la trachée. Son administration répétée par injection sous cutanée induit des sarcomes localisés au point d'injection. Les mécanismes de formation tumorale correspondent à la fois à une prolifération cellulaire et à des dommages génétiques. Toutefois, des études de cancérogenèse réalisées sur la peau de souris ont montré que le benzo[a]pyrène est l'hydrocarbure aromatique polycyclique induisant le plus grand nombre de tumeurs dans le délai le plus court après le dibenzo[a,h]anthracène. Il est considéré comme étant un initiateur tumoral pouvant induire 80-92 % de papillomes avec promotion par l'acétate de tétradécanoyl phorbol ou l'huile de croton [Cavaliere et al. (1988)]. Il existe également des données d'écotoxicité aiguë et chronique concernant les organismes aquatiques et consignées dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Valeurs d'écotoxicité aiguë et chronique de certains organismes exposés au benzo[a]pyrène.

Organisme	Ecotoxicité	Espèce	Critère d'effet	Valeur (µg/L)	Références
Micro-crustacés	Aiguë	<i>Daphnia magna</i>	CL50 (48h)	> 2,7	Vindimian (2000)
	Chronique	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE10 (7j)	0,50 ¹	Vindimian (2000)

¹ tient compte de la décroissance des concentrations au cours du temps.

○ Le dibenzo[a,h]anthracène

Le dibenzo[a,h]anthracène est classé en groupe 2B (CIRC), en catégorie 2 (Union Européenne), en classe B2 (US EPA) et est considéré comme substance cancérigène pour l'homme. Son caractère génotoxique n'a pas été examiné par l'Union Européenne. En revanche, des études *in vitro* ont montré le caractère mutagène du dibenzo[a,h]anthracène. Chez l'homme, aucune donnée n'est disponible concernant l'exposition aiguë et chronique. Chez l'animal, l'exposition aiguë par voie cutanée induit une suppression des glandes sébacées et une réduction de la croissance de la rate. Par exposition chronique au dibenzo[a,h]anthracène par voie orale des souris males et femelles ont développé des adénomes pulmonaires, un carcinome pulmonaire et un hémangio-endothéliome du pancréas et des nodules lymphatiques mésentériques. Des carcinomes mammaires ont été observés chez des souris femelles. Par voie cutanée, le dibenzo[a,h]anthracène induit des carcinomes et des papillomes à l'endroit appliqué chez des souris [Wynder et Hoffmann (1959)]. Il en est de même chez des souris où 92% ont développé des adénomes pulmonaires. D'autres études mettent en évidence l'effet initiateur de tumeur pour la plus forte dose testée (600 nmol). En écotoxicologie, aucune donnée fiable de toxicité aiguë et chronique du dibenzo[a,h]anthracène sur les organismes aquatiques ou terrestres n'a pu être trouvée.

2 Devenir des HAP dans l'organisme

Très peu de données concernant l'absorption et le devenir des HAP dans l'organisme humain sont disponibles. Cependant il semblerait que les HAP pénètrent dans l'organisme par voie pulmonaire, orale ou cutanée. Les HAP en présence d'enzymes, telle que le cytochrome P450, subissent une oxydation donnant lieu à des époxydes (époxydation) qui seront donc transformés par les époxy-hydrolases en dihydrodiols [CIRC (1983) ; Wislocki et Lu (1988)]. Sous l'action des monooxygénases microsomiques, ils seront donc époxydés en époxydes-

diols. Les époxydes-diols à région convexe sont considérés comme étant les principaux agents cancérigènes pour la plupart des HAP, bien que d'autres intermédiaires réactifs peuvent également être importants [CIRC (1983) ; Santodonato *et al.* (1981)]. Tous ces modèles provenant d'études animales *in vitro* et *in vivo* indiquent que ces mécanismes sont vraisemblablement pertinents pour les humains [ATSDR (1990)]. Voyons le cas de quelques HAP ci-dessous.

○ Le chrysène

Les études *in vitro* réalisées par des chercheurs sur le foie de rats, la peau humaine ou la peau de souris ont montré que la transformation métabolique du chrysène donnait naissance aux 1, 2-, 3, 4- et 5, -dihydrodiol ainsi qu'aux dérivés 1-, 3-, et 4-phénol [Jacob *et al.* (1987)]. On a également la formation d'agents alkylants tel que le 1,2-dihydrodiol-3, 4-époxyde ainsi que du 9-hydroxychrysène 1,2-dihydrodiol-3,4-oxide. Le 1,2-dihydrodiol possède des propriétés mutagènes [Cheung *et al.* (1993)].

○ Le benzo[b]fluoranthène

L'étude faite par Amin *et al.* (1982) a montré que les métabolites du benzo[b]fluoranthène sont le 1,2-dihydrodiolbenzo[b]fluoranthène, le 11,12-dihydrodiolbenzo[b]fluoranthène, le 4- ou le 7-monohydroxybenzo[b]fluoranthène et le 5- ou 6-onohydroxybenzo[b]fluoranthène. Les époxydes dihydrodiols issus de ce métabolisme ne semble pas induire d'effet génotoxique. En revanche, le 5,9,10-trihydroxy-11, 12 époxy-9, 10, 11, 12-tétrahydrobenzo[b]fluoranthène semble être lié à une activité génotoxique observée sur la peau de souris ayant été exposées au benzo[b]fluoranthène [Weyand *et al.* (1993)].

○ Le benzo[a]pyrène

Son absorption est très rapide et sa distribution dans les organismes internes se fait de quelques minutes à quelques heures. Sa très forte liposolubilité lui permet de se stocker dans les organes riches en graisses puis relargué ensuite dans le sang [CNRC (1983)]. Le benzo[a]pyrène subit une oxydation induite par les cytochromes P450, donnant des époxydes dont la transformation par les époxy-hydrolases, conduit aux dihydrodiols. Ces derniers sont ensuite oxydés en diol époxydes puis en tétrols par le cytochrome P450. Ces tétrols obtenus se lient de façon covalente aux macromolécules des cellules (protéines, ADN) pour former des adduits. Ces adduits, en général, provoquent des mutations génétiques et sont donc considérés comme des agents d'initiation de la cancérogenèse. Ce métabolisme peut être également influencé par le métabolisme oxydatif.

○ *Le dibenzo[a,h]anthracène*

Des études *in vitro* réalisées sur des animaux ont révélé que le métabolisme du dibenzo[a,h]anthracène implique la formation de dihydrodiols tel que le 3, 4-dihydrodiol, principal précurseur du dibenzo[a,h]anthracène diol-époxyde, composé considéré comme cancérigène.

3. Bibliographie

- Amin S., Lavoie E. J. et Hecht S. S. Identification of metabolites of benzo[b]fluoranthene *Carcinogenesis*, (1982) **3**(2): 171-174.
- Amin S., Hussain N., Balanikas G., Huie K. et Hecht S. S. Mutagenicity and tumor initiating activity of methylated benzo[k]fluoranthnes *Cancer Research*, (1985) **26**(3): 343-347.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) Toxicological profile for benzo(a)pyrene *ATSDR/TP-88-05*, (1990a).
- ATSDR ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) Toxicological profile for benzo(a)pyrene *ATSDR/TP-90-20*, (1990b).
- Bastian M. V. et Toetz D. W. Effect of polynuclear hydrocarbons on algal nitrogen fixation (acetylene reduction) *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, (1985) **35**: 258-265.
- Brune H., Deutsch-Wenzel R. P., Habs M., Ivankovic S. et Schmahl D. Investigation of tumorigenic response to benzo[a]pyrene in aqueous caffeine solution applied orally to Sprague-Dawley rats *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, (1981) **102**(2): 153-157.
- Brunstrom B., Broman D. et Naf C. Toxicity and EROD-inducing potency of 24 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in chick embryos *Archives of Toxicology*, (1991) **65**(6): 485-489.
- Cavalieri E., Rogan E., Cremonesi P., Higginbotham S. et Salmasi S. Tumorigenicity of 6-halogenated derivatives of benzo[a]pyrene in mouse skin and rat mammary gland *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, (1988) **114**(1): 10-15.
- Cheung Y. L., Gray T. J. et Loannides C. Mutagenicity of chrysene, its methyl and benzo derivatives and their interactions with cytochromes p-450 and the Ah-receptor; relevance to their carcinogenic potency *Toxicology*, (1993) **81**(1): 69-86.
- Conseil National de Recherche Canada (CNRC). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le milieu aquatique : formation, source, devenir et effets sur le biote, Pub. CNRC, n° 18981 (1983) Ottawa, Ontario.
- Foran J. A., Holst L. L. et Giesy J. P. Effects of photoenhanced toxicity of anthracene on ecological and genetic fitness of *Daphnia magna* *Environmental and Toxicological Chemistry*, (1991) **10**: 425-427.
- Gala W. R. et Geisy J. P. Flow cytometric determination of the photoinduced toxicity of anthracene to the green alga *Selenastrum capricornutum* *Environmental and Toxicological Chemistry*, (1994) **13**(5): 831-840.
- Gershbein L. L. Liver regeneration as influenced by the structure of aromatic and heterocyclic

- compounds *Research Community of Chemical Pathology and Pharmacology*, (1975) **11**(3): 445-466.
- Habs M., Schmahl D. et Misfeld J. Local carcinogenicity of some environmentally relevant polycyclic aromatic hydrocarbons after lifelong topical application to mouse skin *Arch Geschwulstforsch*, (1980) **50**(3): 266--274.
- Hatch A. C. et Burton G.A. Photo-induced toxicity to *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* : effects of mixtures and behavior, *Environmental Pollution* (1999) 106: 157-167.
- Heller W. Experimental study on tumours produced by light *Strahlentherapie*, (1950) **81**: 529-548.
- Hoch-Ligeti C. Studies on the changes in the lymphoid tissue of mice treated with carcinogenic and noncarcinogenic hydrocarbons *Cancer Research*, (1941) **1**: 484-488.
- Hoffmann D. et Gay M. L. Embryotoxic effects of benzo[a]pyrene, chrysene and 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene in petroleum hydrocarbons mixtures in Mallard ducks *Journal of Environmental and Toxicological Health*, (1981) **7**: 775-787.
- Hodgson R. M., Seidel A., Bochnitschek W., Glatt H. R., Oesch F. et Grover P. L. The formation of 9-hydroxychrysene-1,2-diol as an intermediate in the metabolic activation of chrysene *Carcinogenesis*, (1985) **6**(1): 135-139.
- Hoofman R. J. et Ruiter E. (1992a). Investigations into aquatic toxicity of phenanthrene. Delft, Netherlands, TNO Institut of Environmental Sciences.
- Huang X. D., Krylov S. N., Brendan L. R., McConkey J., Dixon D. J. et Greenberg B. M. Mechanistic quantitative structure-activity relationship model for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons: II An empirical *Environmental and Toxicological Chemistry*, (1997) **16**(11): 2296-2303.
- IARC International Agency for Research on Cancer- Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemical to humans ; <http://www.inchem.org/documents/iarc/iarc740.htm>, (1987).
- IARC International Agency for Research on Cancer- Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1, volume 32 (1983) Lyon.
- IARC International Agency for Research on Cancer- Summaries and Evaluations, 5. Summary of data reported and evaluation, (1991) **51**.
- IARC Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1: Chemical, environmental and experimental data. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to human. Lyon. France, (1983).
- IARC Pyrene-groupe 3 IARC <http://www.inchem.org/documents/iarc/iarc740.htm>, (1987).
- Jacob J., Schmoldt A. et Grimmer G. Formation of carcinogenic and inactive chrysene metabolites by rat liver microsomes of various monooxygenase activities *Archives of Toxicology*, (1982) **51**: 255-265.
- INERIS Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Fluoranthène (2003). <http://www.ineris.fr/download/fluoranthene.pdf>.
- INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE ET DE SECURITE (INRS) — Arsenic et composés minéraux, fiche toxicologique n° 192 ; cadmium et composés minéraux, fiche toxicologique n° 60 ; mercure et composés minéraux, fiche toxicologique n°

55 ; plomb et composés minéraux, fiche toxicologique n° 59 ; polychlorobiphényles, fiche toxicologique n° 19. Institut National de Recherche et de Sécurité, (1992), Paris. <http://www.inrs.fr/indexnosdoss.html>

- IRIS U. E. Anthracene- Carcinogenicity Assessment, U.S. Environmental Protection Agency <http://www.epa.gov/ngispgm3.iris/>, (1991).
- IRIS U. E. Fluoranthene- Carcinogenicity Assessment For Lifetime Exposure <http://www.epa.gov/ngispgm3.iris/>, (1990).
- IRIS. U. E. Fluoranthene- Carcinogenicity Assessment For Lifetime Exposure. <http://www.epa.gov/ngispgm3.iris/>, (1990).
- Jacob J., Schmoldt A., Hamann M., Raab G. et Grimmer G. Monooxygenase induction by various xenobiotics and its influence on rat liver microsomal metabolism of chrysene in comparison to benz(a)anthracene *Cancer Letters*, (1987) **34**(1): 91-102.
- JOCE Commission Directive 200/32/EC, 26th time Council directive 67/548EEC. *official Journal of the European Communities*, (2000).
- Kennaway E. L. On cancer producing tars and tar-fractions *Journal of Industrial Hygiene*, (1924) **5**: 462-488.
- Kochevar I. E., Armstrong R. B., Einbinder J., Waither R. R. et Harber L. C. Coal tar phototoxicity: Active compounds and action spectra. *Photochem Photobiol*, (1982) **36**: 65-69.
- Millemann R. E., Birge W. J., Black J. A., Cushman R. M., Daniels K. L., franco P. J., Giddings J. M., McCarthy J. F. et Stewart A. J. Comparative acute toxicity to aquatic organism of components of coal-derives synthetic fules *Transactions of the American Fisheries Society*, (1984) **113**: 74-85.
- Munoz M. J. et Tarazona J. V. Synergistic effect to two- and four- component combinations of the polycyclic aromatic hydrocarbons: phenanthrene, anthracene, naphtalene and acenaphtene on *Daphina manga Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, (1993) **50**(3): 363-368.
- Rababah A. et Matsuzawa S. Treatment system for solid matrix contaminated with Fluoranthene. II-Recirculating photo degradation technique. *Chemosphere* (2002) **46**: 49-57.
- RAIS http://rais.ornl.gov/profiles/pyrene_f_V l.shtml#te (1993).
- Renoux A.Y., Millette D., Tyagi D. et Samson R. Detoxification of fluorine, phenanthrene, carbozole and p-cresol in columns of aquifer sand as studied by the Microtox® assay, *Water Research* (1999) **3**(9): 2045-2052.
- Rigdon R. H. et Neal J. Gastric carcinomas and pulmonary adenomas in mice fed benzo[a]pyrene *TEXAS REPORTS ON BIOLOGY AND MEDICINE*, (1966) **24**(2): 195-207.
- Santodonato J. P., Howard P. et Basu D. Health and Ecological assessment of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, (1981) **5**: 1-368.
- Saunders C. R., Shockley D. C. et Knuckles M. E. Fluoranthene-induced neurobiological toxicity in F-344 rats *International Journal of Toxicology*, (2003) **22**(4): 263-276.

- Smyth H. F., Carpentier C.P., Weil C.S, Pozzani U.C. et Striegel J.A. Range finding toxicity data: List VI. *Journal of American Industrial Hygiene* (1969) 23: 95-107.
- Spehar R. L., Poucher S., Brook L. T., Hansen D. J., Champlin D. et Cox D. A. Comparative toxicity of fluoranthene to freshwater and saltwater species under fluorescent and ultraviolet light *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, (1999).
- Thursby G. B., Berry W. J. et Champlin D. Flow-through acute and chronic tests with acenaphthalene using *Mysidopsis bahia*, Memorandum to David J. Hansen, (1989).
- US EPA (IRIS). Benzo[b]fluoranthène. US environmental Agency- Integrated Risk Information System-Carcinogenicity Assessment for lifetime exposure. <http://www.epa.gov/ngispm3/iris/>. (1994).
- US EPA (IRIS). Benzo[k]fluoranthène. U.S. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System- Carcinogenicity assessment of lifetime exposure <http://www.epa.gov/ngispgm3.iris/>, (1989).
- Vindimian E., Bisson M., Dujardin R., Flammarion P., Garric J., M. B., Lamy M-H., Porcher J. M. et Thybaud E. (2000). Complément au SEQ-Eau: Méthode de détermination des seuils de qualité pour les substances génotoxiques, INERIS, Agence de l'eau Rhine-Meuse.
- Weinstein J. E. et Polk K. D. Phototoxicity of anthracene and pyrene to glochidia of the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* *Environmental and Toxicological Chemistry*, (2001) **20**(9): 2021-2028.
- Weyand E. H., Geddie N., Rice J. E., Czech A., Amin S. et Lavoie E. J. Metabolism and mutagenic activity of benzo[k]fluoranthene and 3-,8- and 9-fluorobenzo[k]fluoranthene *Carcinogenesis*, (1988) **9**(7): 1277-1281.
- Weyand E. H., Cai Z. W., Wu Y., Rice J. E., He Z. M. et LaVoie E. J. Detection of the major DNA adducts of benzo[b]fluoranthene in mouse skin: role of phenolic dihydrodiols *Chemical Research and Toxicology*, (1993) **6**(4): 568-577.
- Wislocki P. G. et Lu A. Y. H. Carcinogenicity and Mutagenicity of proximate and ultimate carcinogens of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (1988). CRC Press Inc.
- Wynder E. L. et Hoffmann D. Tobacco and tobacco smoke. Academic Press. (1967). New York.

ANNEXE 4: LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE COUPLEE A UN DETECTEUR DE FLUORESCENCE

Dans le cas de l'HPLC-FD utilisée, tous les solvants ont été dégazés aux ultrasons avant chaque analyse, pour éliminer l'oxygène contenu dans les solvants afin d'éviter toute variation de débit et la diminution de la fluorescence des HAP.

○ Caractéristiques de l'appareillage

La chaîne HPLC-FD est composée des éléments suivants :

- Une pompe gradient basse pression : Varian 9010
- Une Vanne d'injection : Rhéodyne 7125 équipée d'une boucle d'injection de 20 μ L.
- Une pré-colonne : silice greffée C₁₈.
- Une colonne silice greffée C₁₈: Supelcosil LC-PAH 25 cm \times 4.6 mm (5 μ m).
- Un four (Waters Column Heater Module) piloté par un régulateur (Waters Temperature Control Module) pour fixer la température de la colonne.
- Un détecteur de fluorescence : Thermo Quest FL 3000.
- L'acquisition et le traitement des données sont réalisés à l'aide du logiciel Turbochrom TC4 Navigator.

○ Programme d'analyse par HPLC-FD

Programme du gradient de phase mobile

Le débit de la phase mobile est de 1.5 mL.min⁻¹. Dans la première partie de notre travail la température de la colonne n'a pas été régulée, et donc le gradient de phase mobile a été parfois modifié selon la température de la pièce. Par contre ensuite la colonne a été placée dans un four à température constante (35 °C), et le gradient d'analyse a été le suivant :

Temps (min)	Phase mobile
0-15	100% Acétonitrile/eau 60/40 (v/v)
15-20	100% Acétonitrile/eau 60/40
20-45	Passage de Acétonitrile/eau 60/40 (v/v) à 100% Acétonitrile
45-50	100% Acétonitrile
50-55	Passage de 100% Acétonitrile à 100% Acétonitrile/eau 60/40

Programme d'analyse du détecteur de fluorescence

En l'absence de régulation de la température de la colonne HPLC, les temps de rétention des HAP subissaient des variations journalières : il fallait donc ajuster les fenêtres de temps lors de la programmation des longueurs d'onde du détecteur, à l'aide de l'analyse de solutions standards des HAP. Ce problème a ensuite été réglé grâce au four utilisé.

Pour l'analyse des 3 HAP modèles effectuées au début de ce travail, la programmation du détecteur a été en règle générale la suivante (quelques modifications des fenêtres de temps ayant été réalisées en l'absence du four) :

Temps (min)	$\lambda_{\text{excitation}}-\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	HAP
0-10	320-510	-
10-19	230-410	Fluoranthène
19-50	250-420	B[b]F, B[a]P

La recherche des 16 HAP a nécessité une autre programmation des longueurs d'onde. En l'absence de régulation de la température de la colonne, le programme général a été le suivant (moyennant quelques modifications ponctuelles des fenêtres de temps certains jours) :

Temps (min)	$\lambda_{\text{excitation}}-\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	HAP
0-10*	220-340	Acénaphène, Fluorène
10-16	230-410	Phén, Anthr, F, Pyr
16-24	280-380	B[a]A, Chrys
24-31	250-420	B[b]F, B[k]F, B[a]P
31-50	286-420	DB[ah]A, B[ghi]P

* lors de l'analyse des extraits n'ayant pas subi de traitement de saponification, les longueurs d'onde ont été modifiées durant les 4 premières minutes pour éviter la saturation du détecteur : $\lambda_{\text{excitation}}-\lambda_{\text{émission}}$ (nm) = 320-510.

L'analyse des 16 HAP par HPLC-FD avec température régulée de la colonne à 35°C a permis de réduire le temps d'analyse à 40 min. Le programme définitif du détecteur de fluorescence dans le temps est le suivant :

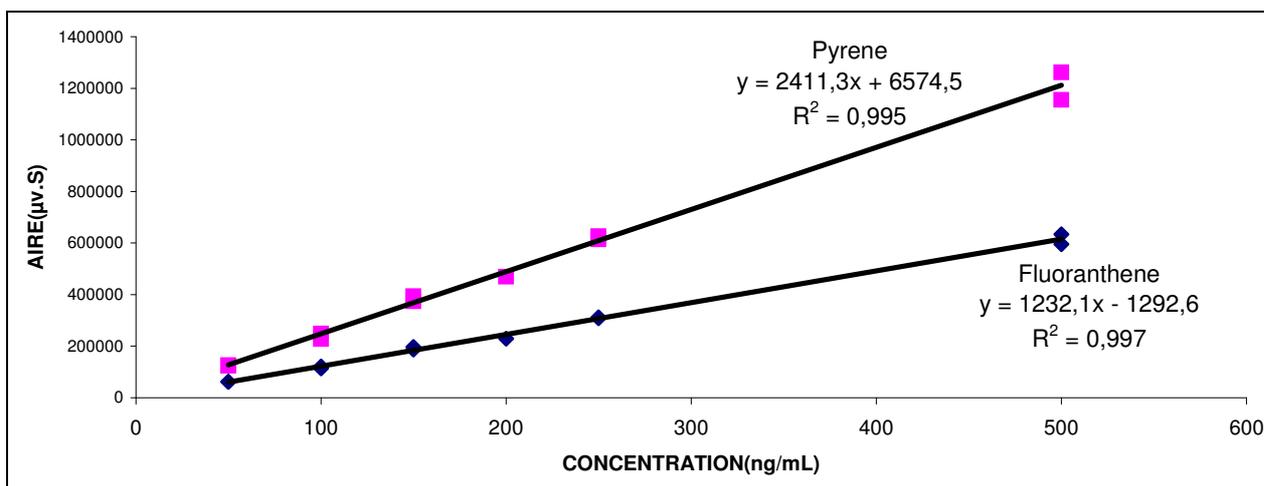
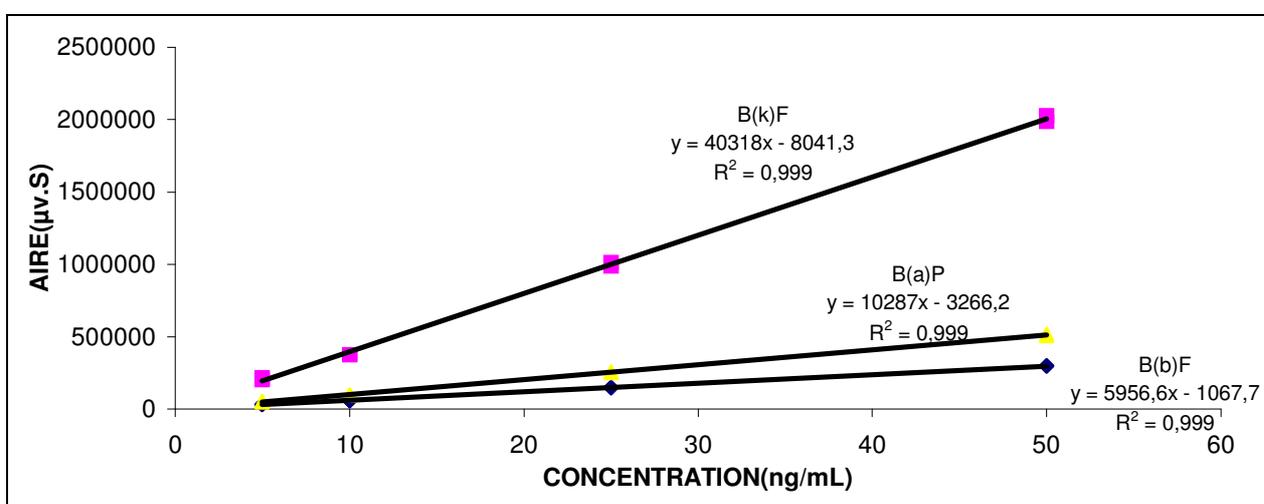
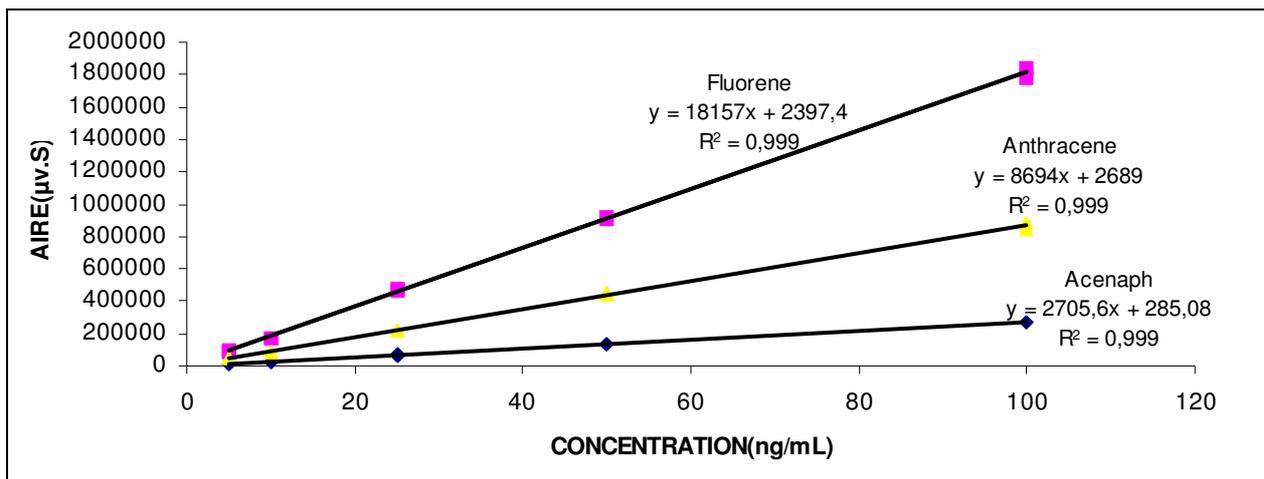
Temps (min)	$\lambda_{\text{excitation}}-\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	HAP
0-9.5	220-340	Acénaphène, Fluorène
9.5-16.5	230-410	Phén, Anthr, F, Pyr
16.5-20	280-380	B[a]A, Chrys
20-27.5	250-420	B[b]F, B[k]F, B[a]P
27.5-40	286-420	DB[ah]A, B[ghi]P

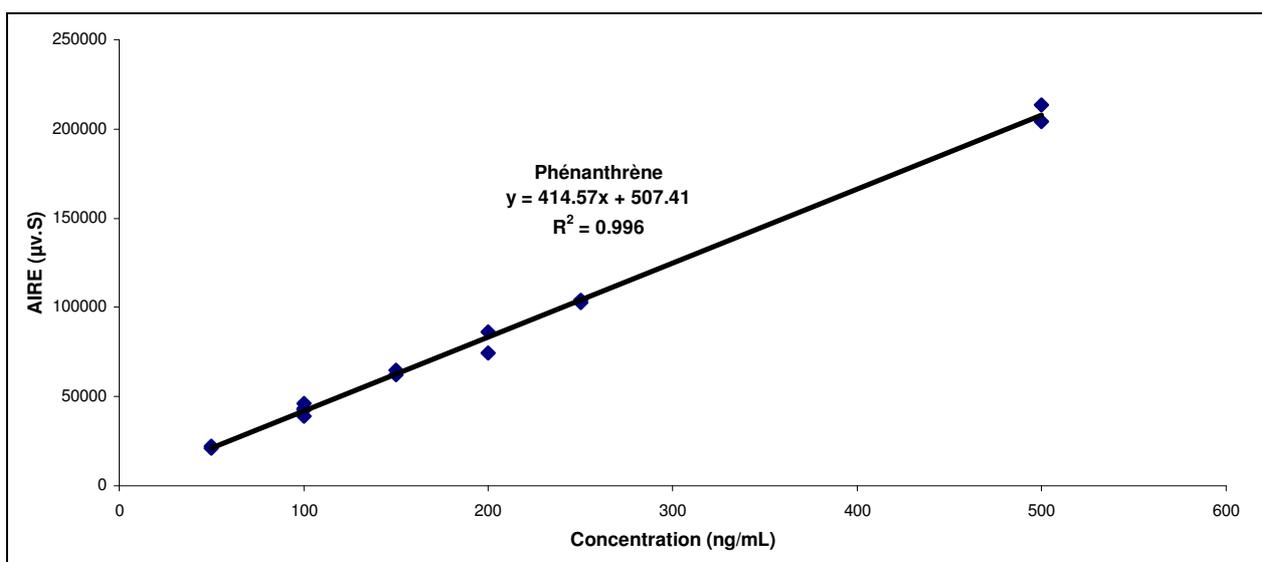
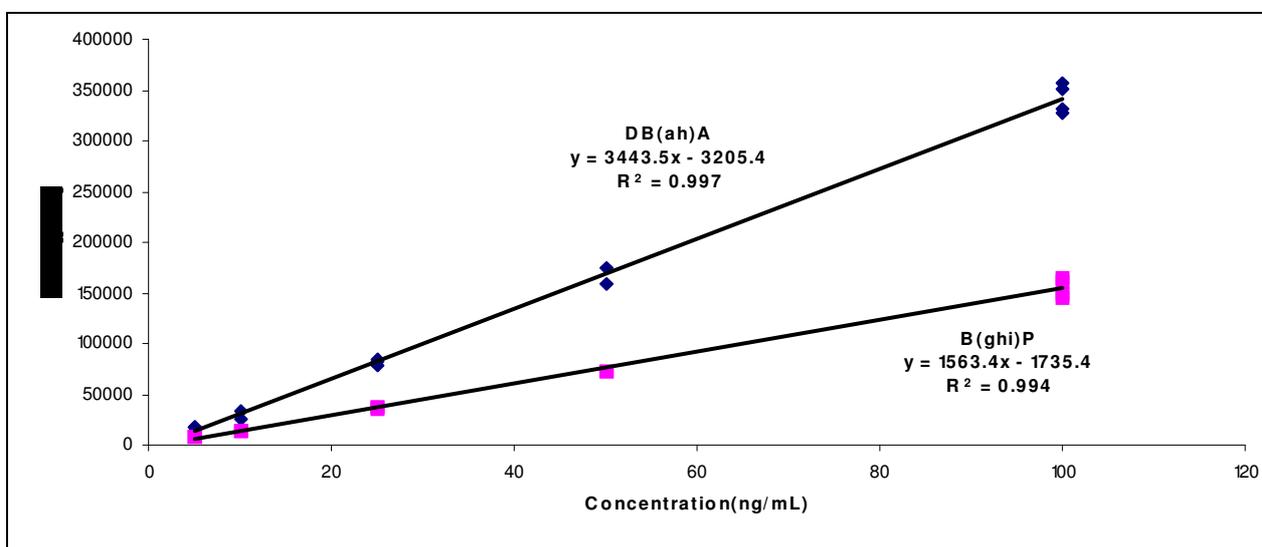
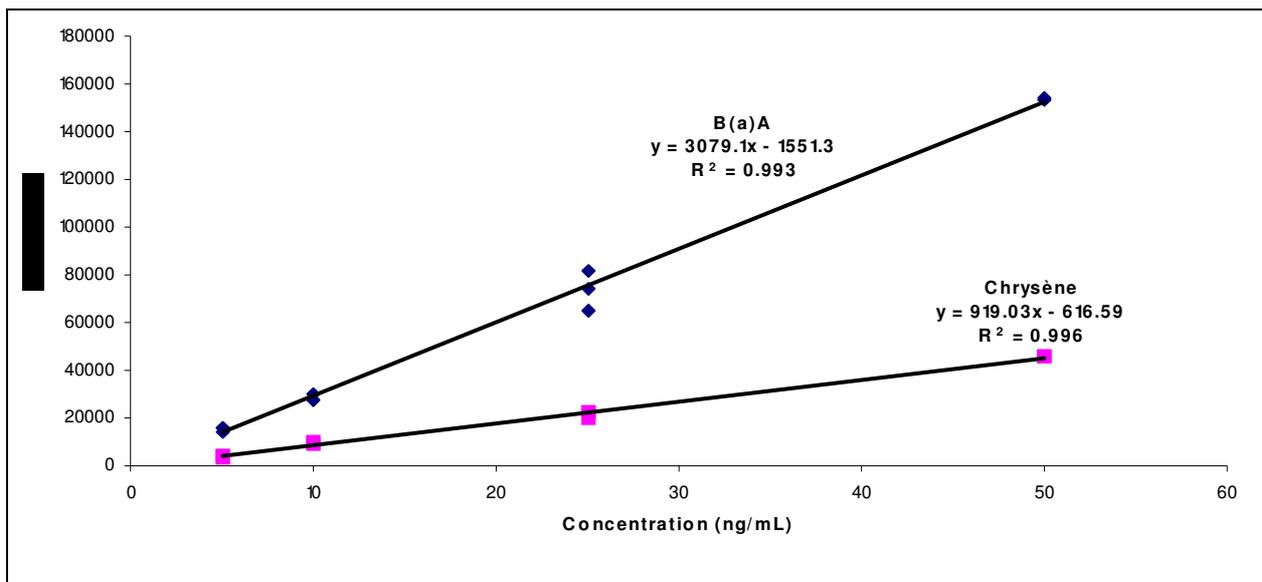
Parmi les 16 HAP analysés, trois d'entre eux n'ont pu fluorescer avec le programme établi. Ce sont le naphthalène, l'acénaphthylène et l'indéno[1,2,3-cd]pyrène. Les différents temps de rétention des 13 HAP retenus sont donnés dans le tableau suivant :

HAP	Temps de rétention (min)
Acénaphthène	5.80
Fluorène	6.63
Phénanthrène	10.40
Anthracène	11.74
Fluoranthène	13.22
Pyrène	14.50
B[a]A	18.09
Chrysène	18.88
B[b]F	22.55
B[k]F	24.14
B[a]P	25.96
DB[ah]A	28.07
B[ghi]P	29.78

○ Quantification des HAP par HPLC-FD

L'analyse quantitative des HAP a été réalisée en se basant sur l'aire des pics chromatographiques et la méthode d'étalonnage externe. Etant donné que différents solvants ont été utilisés dans nos analyses, plusieurs courbes d'étalonnage ont été tracées pour ces différents solvants. A titre d'exemple sont représentées ci-dessous les courbes d'étalonnage obtenues avec comme solvant le tétrahydrofurane (THF). L'analyse de solutions standards a été réalisée quotidiennement afin de vérifier la validité des étalonnages, et si nécessaire refaire la gamme d'étalonnage.





○ Détermination des limites de détection pour les HAP recherchés

Pour déterminer les limites de détection (LOD) nous avons effectué des blancs d'analyse, en suivant la procédure complète d'analyse sur un échantillon contenant l'ensemble des constituants, à l'exception de la substance recherchée. Ensuite on détermine l'amplitude maximale du signal sur une distance égale à vingt fois la largeur à mi-hauteur du pic correspondant à la substance recherchée. On détermine le bruit en multipliant cette hauteur par trois (3) et on calcule la concentration théorique correspondante au composé recherché dans le blanc en utilisant les courbes d'étalonnage externe tracées à partir des solutions étalons à différentes concentrations (hauteur = f(concentration)) ; on détermine ensuite la masse du composé correspondant dans le blanc en multipliant la concentration calculée précédemment par le volume de l'extrait analysé. Cette masse obtenue divisée par la masse de l'échantillon de départ correspond à la limite de détection du composé recherché. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

Composés	Blancs	Bruit	Blancs	Blancs	LOD café
	Hauteurs(μ v)	3*hauteurs	Conc (μ g/L)	Masse (ng)	moulu (μ g/kg)
Acénaphène	140	420	2.54	1.02	0.20
Fluorène	250	750	4.19	1.67	0.33
Phénanthrène	80	240	1.65	0.66	0.13
Anthracène	80	240	1.65	0.66	0.13
Fluoranthène	80	240	1.65	0.66	0.13
Pyrène	100	300	1.95	0.78	0.16
B[a]A	80	240	1.65	0.66	0.13
Chrysène	60	180	1.35	0.54	0.11
B[b]F	80	240	1.65	0.66	0.13
B[k]F	100	300	1.95	0.78	0.16
B[a]P	90	270	1.80	0.72	0.14
DB[ah]A	100	300	1.95	0.78	0.16
B[ghi]P	120	360	2.25	0.90	0.18

ANNEXE 5 : LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE COUPLEE A UN DETECTEUR UV

Cette technique est moins sensible que l'HPLC-FD ; dans le cas de notre étude, nous l'avons utilisée pour confirmer les composés analysés par HPLC-FD à l'aide des spectres d'absorption UV obtenus par comparaison à ceux des standards.

○ Caractéristiques de l'appareillage

La chaîne HPLC couplée à un détecteur UV à barrette de diodes (DAD *diode-array detector*) est composée des éléments suivants :

- Une pompe gradient haute pression : Waters 1525
- Une Vanne d'injection : Rhéodyne (volume de la boucle d'injection : 20 μ L).
- Une pré-colonne : silice greffée C₁₈.
- Une colonne silice greffée C₁₈: Supelcosil LC-PAH 15 cm \times 3 mm (5 μ m).
- Un détecteur DAD : Waters 2996.
- L'acquisition et le traitement des données sont réalisés à l'aide du logiciel Millennium³² PDA.

○ Programme d'analyse par HPLC-UV-DAD

Le débit de la phase mobile est de 0.8 mL.min⁻¹ et le gradient de phase mobile est le suivant :

Tableau 1 : Programme du gradient d'analyse par HPLC-UV-DAD.

Temps (min)	Phase mobile
0-4	Acétonitrile/eau 40/60 (v/v)
4-15	Passage de acétonitrile/eau 40/60 (v/v) à 100 % Acétonitrile
15-24	Acétonitrile 100 %
24-27	Retour à 100 % Acétonitrile/eau 40/60 (v/v)

Les conditions ainsi définies permettent la séparation des 16 HAP et des composés contenus dans nos échantillons de café.

ANNEXE 6 : LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Cette technique est beaucoup plus utilisée dans les laboratoires d'analyse du fait de sa résolution, sa fiabilité, sa robustesse, son faible « bleeding » et sa rapidité d'analyse; elle permet de séparer des composés moléculaires organiques thermostables (non thermolabiles) et volatils naturellement ou rendus volatils à des températures ne provoquant pas leur décomposition (vaporisables) par suite d'équilibre entre la phase gazeuse mobile (gaz vecteur) et la phase stationnaire de la colonne en fonction des différentes températures d'ébullition et de la polarité de chaque composé. Dans notre étude, nous avons utilisé le couplage GC-MS/MS. Ce couplage constitue une approche permettant de réduire le bruit chimique de la matrice et ainsi augmenter le degré de confiance du résultat. De plus le couplage GC-MS/MS a une meilleure sélectivité de détection que les techniques GC-MS à basse et à haute résolution.

1 Le système d'injection

Cette étape est déterminante pour la qualité des résultats obtenus lors de l'analyse chromatographique. Le mode d'injection utilisé est le PTV (*Programmed Temperature Vaporizer*) qui est un injecteur à température programmable. C'est une technique analogue à celle de l'injecteur split/splitless. Il conjugue les avantages de l'injection en mode split, ou splitless, à ceux de l'injection à froid dans la colonne. Dans notre cas nous avons utilisé le mode PTV splitless (utilisé pour l'analyse de traces). Lors de l'injection sans division, à froid, la vanne de fuite est fermée pendant l'injection. La chambre d'injection est ensuite chauffée afin de transférer l'échantillon dans la colonne maintenue froide.

2 La détection par spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS)

Ce couplage est un outil d'identification très efficace car il allie sélectivité et sensibilité. Le MS/MS, est constitué d'une source d'ionisation, de deux analyseurs de masse, séparés par une cellule de fragmentation (cellule de collision) et d'un détecteur d'ions. On utilise le mode MS/MS pour analyser les ions fils. La molécule analysée est donc ionisée et l'ion parent formé est sélectionné par le premier analyseur de masse. Ensuite, cet ion sélectionné (ion parent) est fragmenté par collision avec les molécules du gaz (dissociation induite par collision) pour donner des ions fils qui sont à leur tour séparés dans le second analyseur de masse. Le spectre ainsi obtenu correspond au spectre de l'ion parent.

On a deux types de configurations des spectromètres MS/MS : celle dont les analyseurs sont couplés dans l'espace (*tandem in space*) (cas des analyseurs quadripolaires, magnétiques ou hybrides) et celle dont les analyseurs sont couplés dans le temps (*tandem in time*) (cas des trappes d'ions ou spectromètres de masse à résonance cyclotronique). Parmi ceux-ci, seul le fonctionnement des trappes à ions sera décrit puisque l'appareil que nous avons utilisé est doté de cette technique.

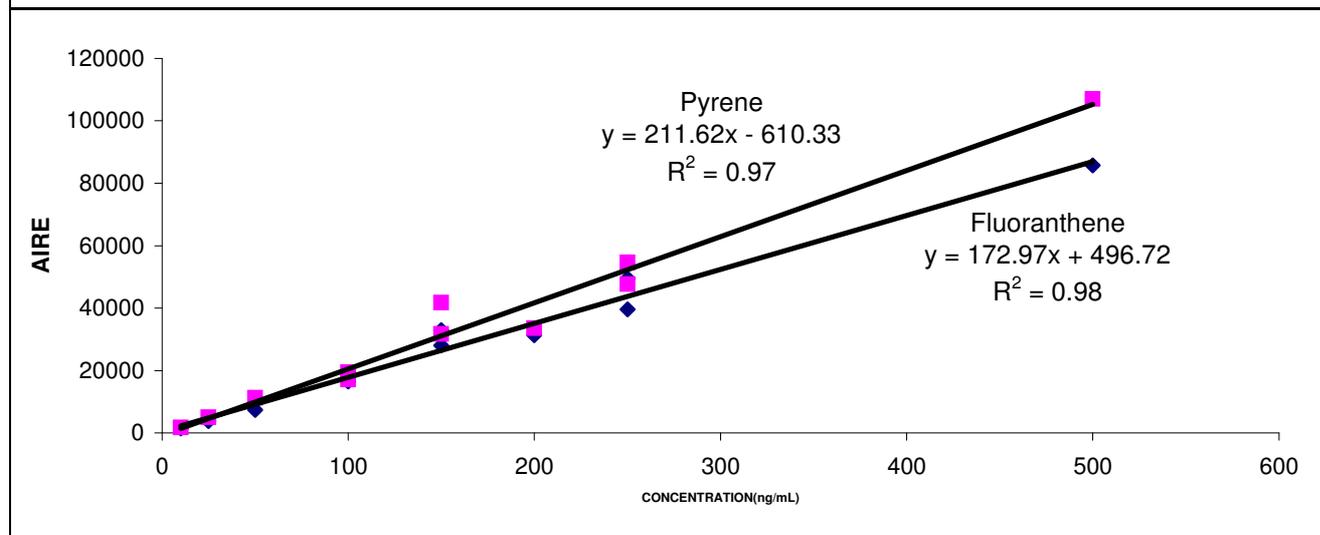
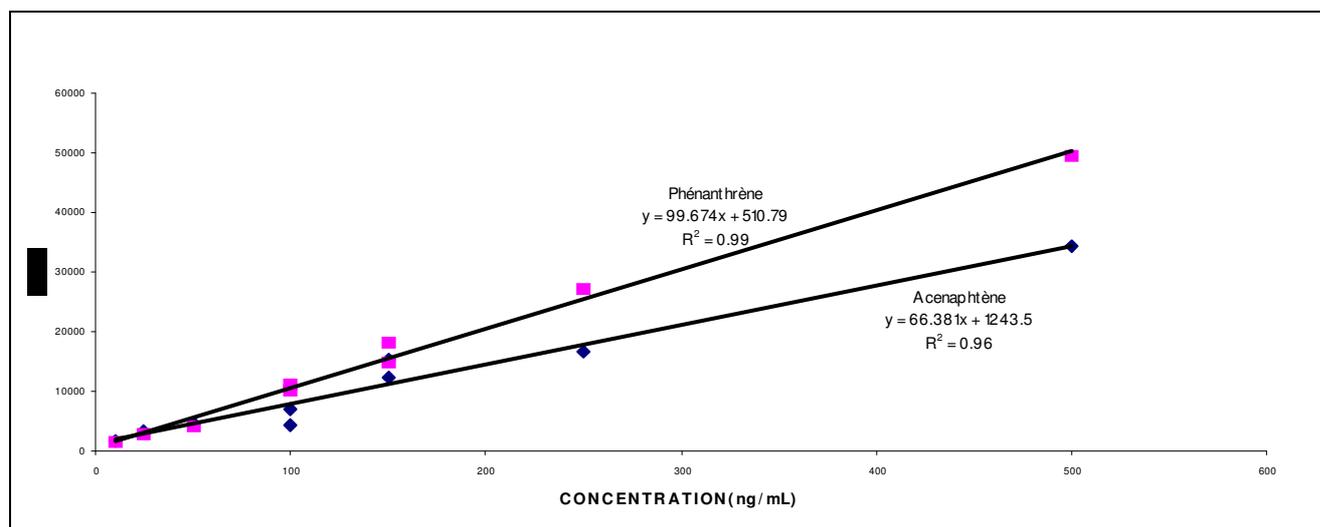
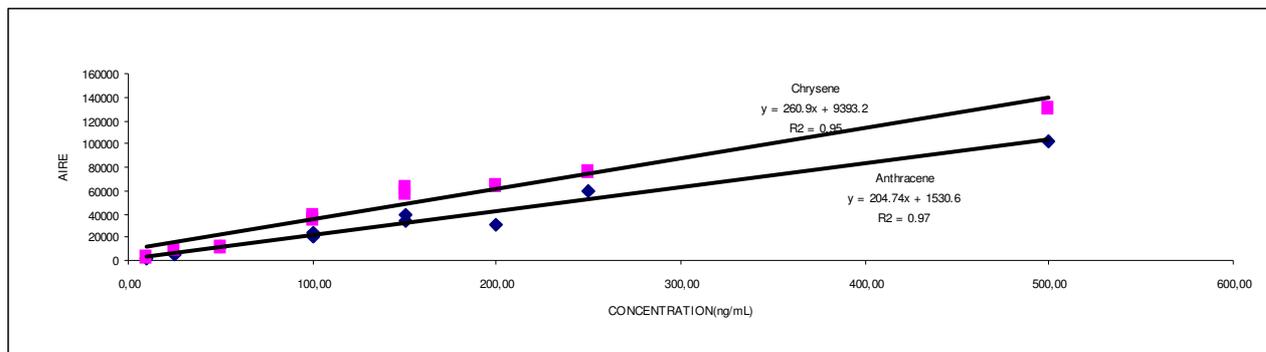
3 Description des trappes ioniques

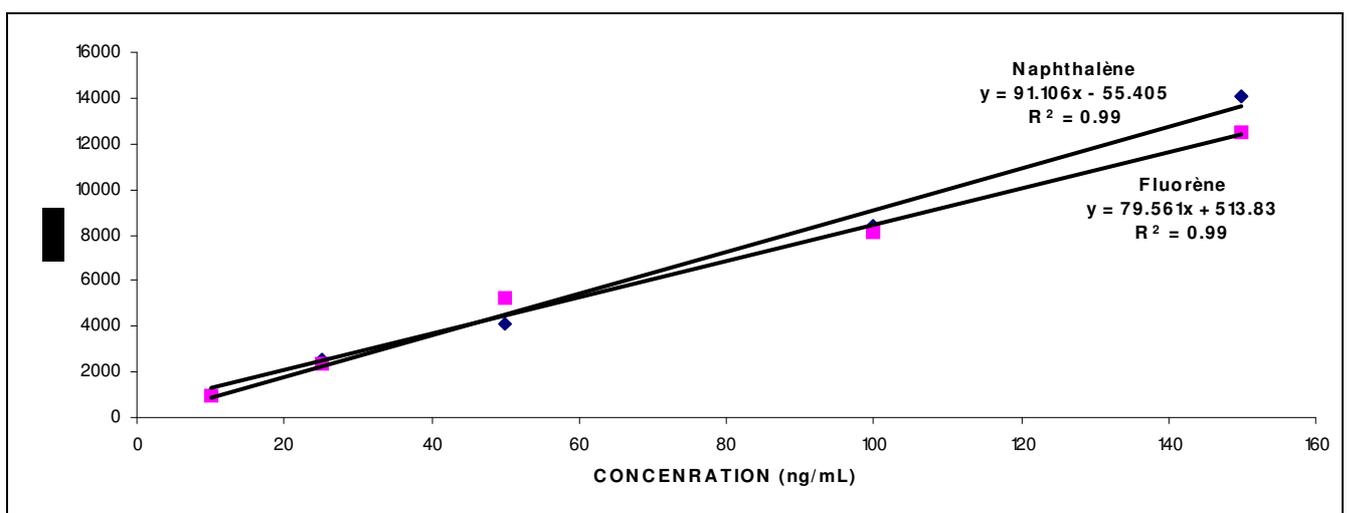
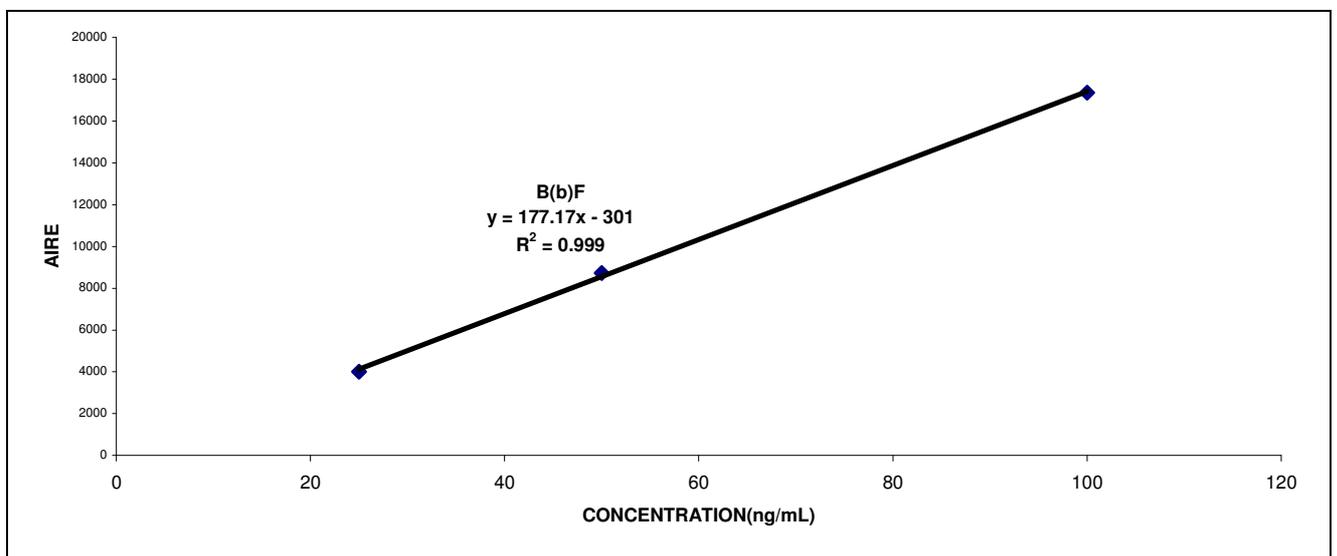
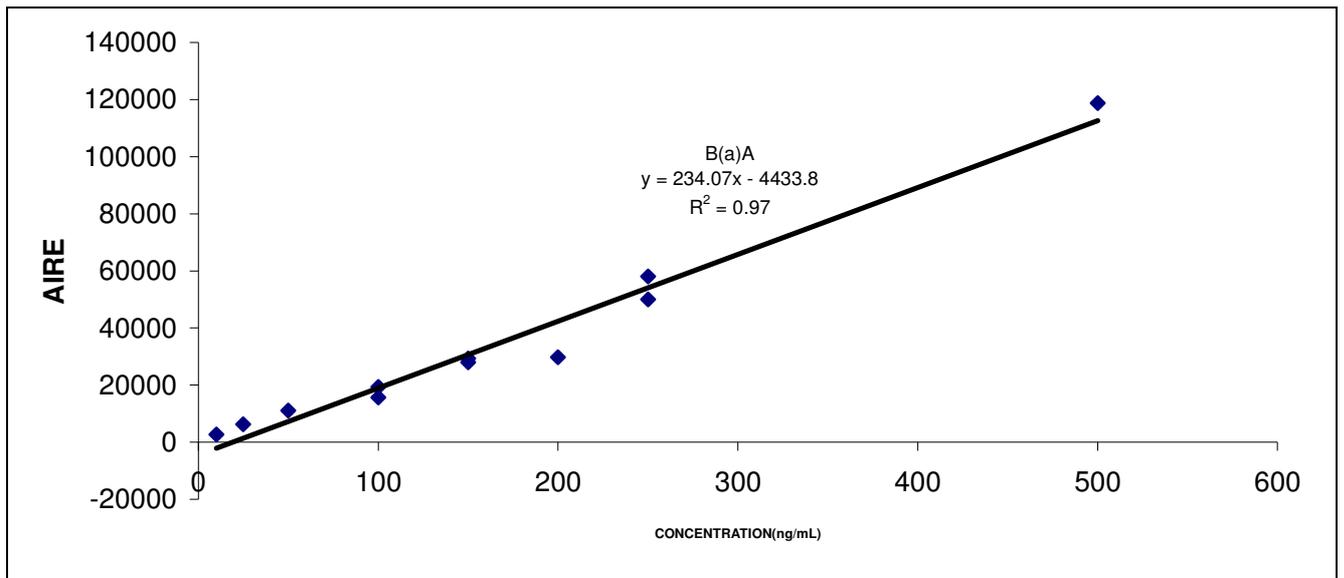
C'est une technique qui permet de produire des ions dans la trappe par impact électronique (IE). La trappe est constituée de trois électrodes dont une annulaire encadrée par deux autres de forme hyperbolique percées en leur milieu pour permettre le passage des ions ou électrons. Un flux d'électrons, provenant d'un filament chauffé, va produire des ions par ionisation des molécules qui sortent de la colonne d'analyse et qui se retrouvent entre les deux électrodes.

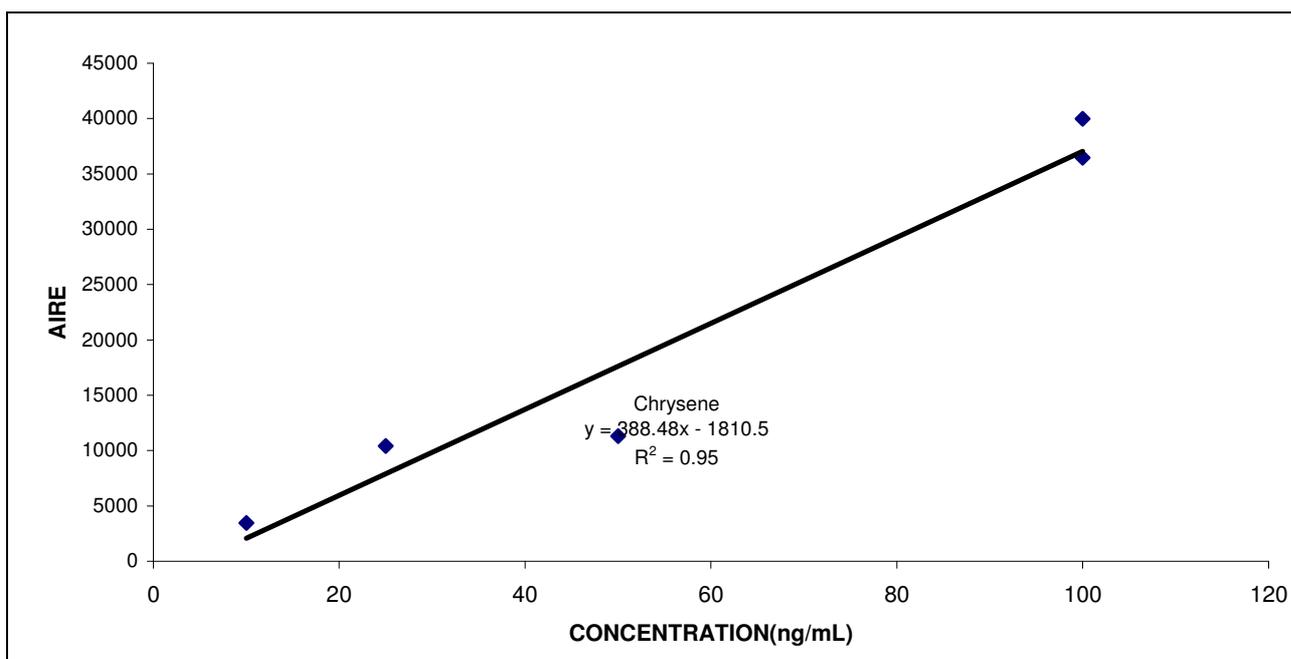
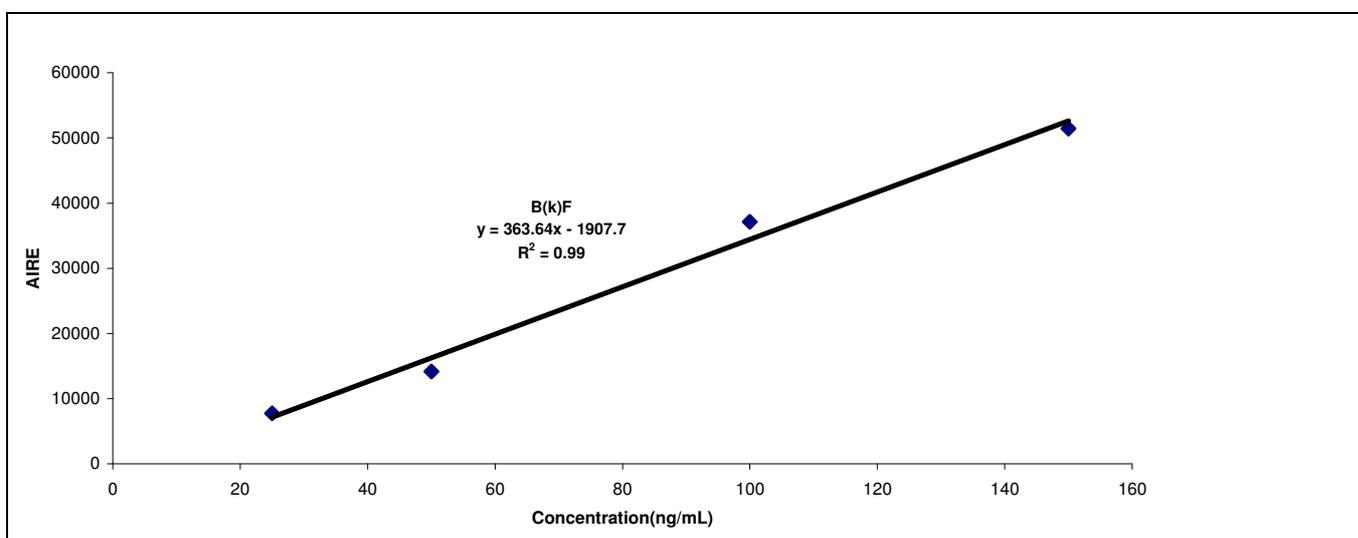
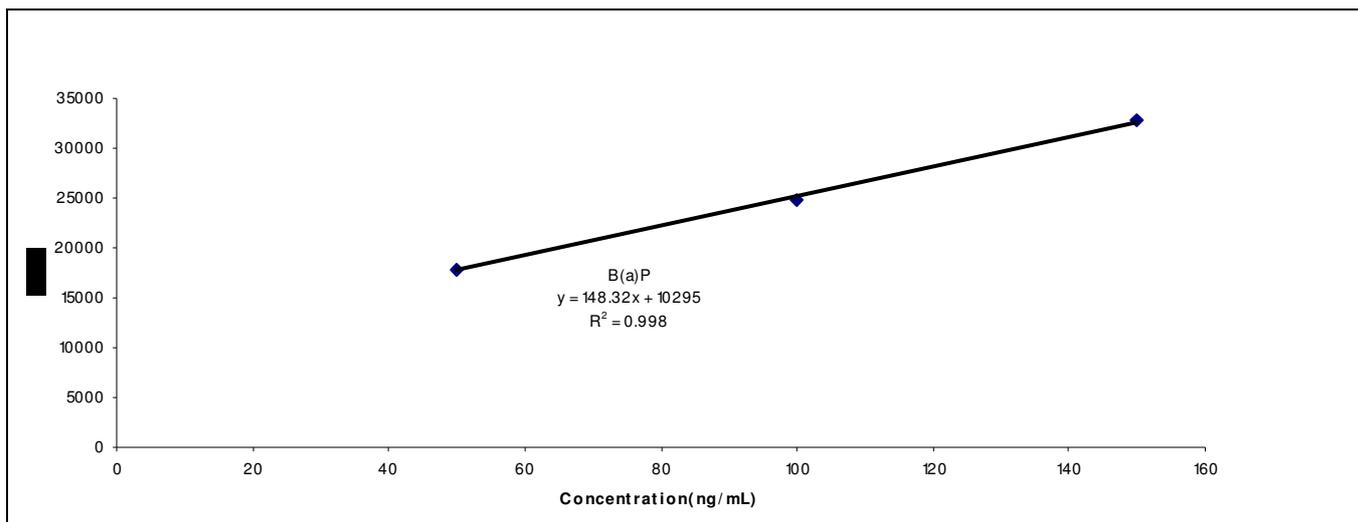
Ces ions produits sont piégés dans la trappe grâce une radiofréquence. Ensuite, ils seront expulsés de la trappe en fonction de leur rapport m/z (masse/charge).

4 Quantification des HAP par GC-MS/MS

L'analyse quantitative des HAP est effectuée grâce à l'aire des pics chromatographiques et à l'utilisation de la méthode d'étalonnage externe. Les courbes d'étalonnage externe des HAP analysés dans le tétrahydrofurane (THF) sont données dans les graphes qui suivent.







ANNEXE 7 : EVALUATION DU POTENTIEL TOXIQUE DU MELANGE DES HAP

L'évaluation du potentiel toxique d'un mélange de plusieurs HAP est possible grâce à une approche fondée sur la notion de facteur d'équivalence toxique (TEF). Cette approche consiste à attribuer à chaque composé du mélange un facteur d'équivalent toxique permettant de rendre compte de sa toxicité par comparaison avec un composé de « référence » (le benzo[*a*]pyrène pour les HAP car c'est le plus toxique). Ainsi, on considère que les doses et les effets de chacun des composés du mélange sont additifs, qu'il n'existe pas d'interactions antagonistes ou synergiques entre les composés du mélange, et qu'ils agissent selon le même mécanisme d'action toxique. Le produit « TEF x concentration du composé » permet d'évaluer pour chaque composé un équivalent toxique (TEQ) ; la somme des équivalents toxiques calculés de tous les composés, permet d'obtenir l'équivalent toxique total du mélange. On a donc la relation :

$$TEQ = \sum [HAP]_i \times TEF_i$$

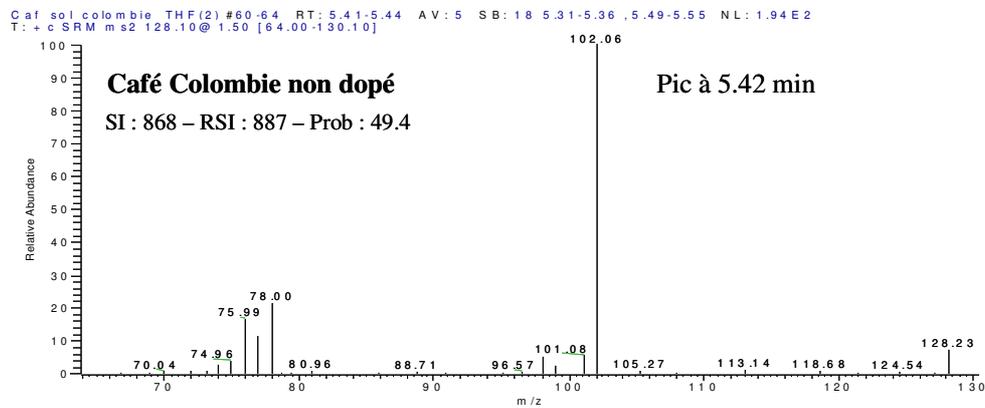
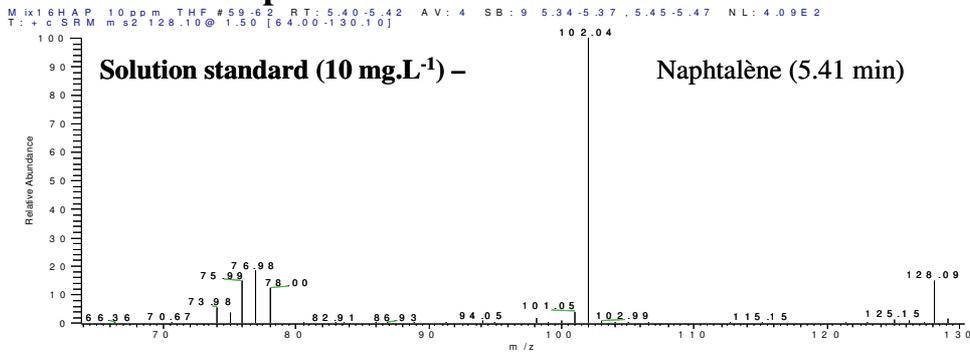
où *i* est un HAP donné, [HAP]_{*i*} la concentration de cet HAP, et TEF_{*i*} son facteur d'équivalence toxique.

Pour les 16 HAP les valeurs des TEF sont données dans le tableau ci-dessous [AFSSA, saisine n° 2000-SA-0005] :

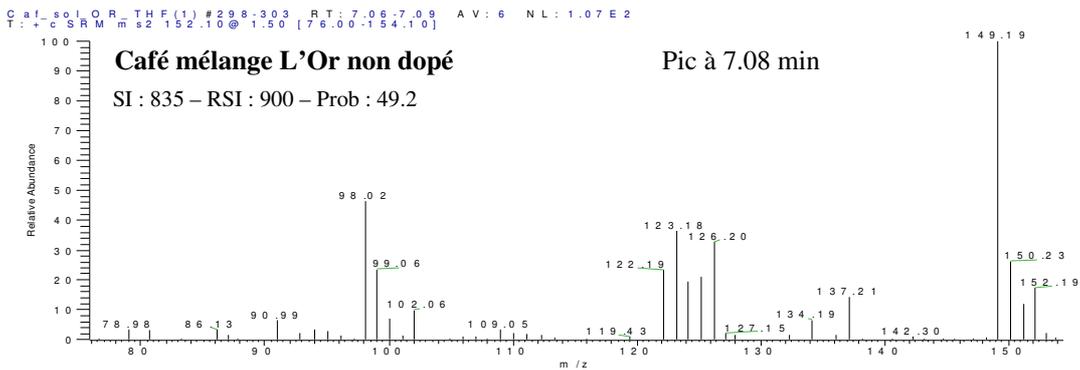
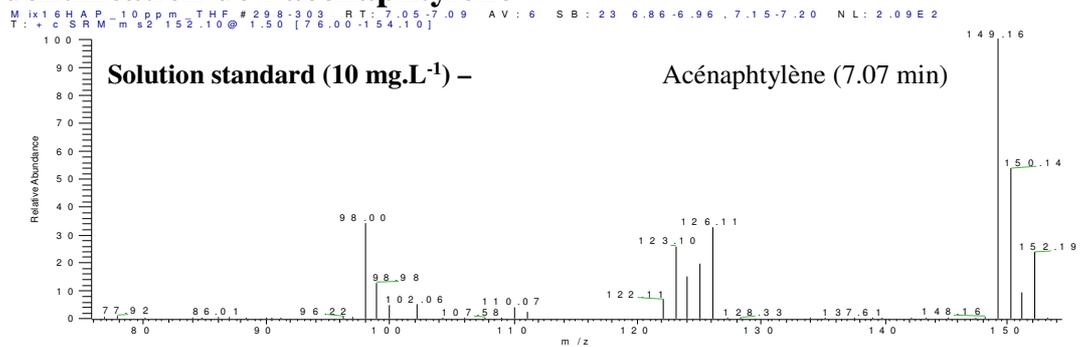
Composé	Classement CIRC	TEF⁽¹⁾
Naphtalène	2B	0.001
Acénaphthylène	---	0.001
Acénaphthène	---	0.001
Fluorène	3	0.001
Phénanthrène	3	0.001
Anthracène	3	0.01
Fluoranthène	3	0.01
Pyrène	3	0.01
Benzo[<i>a</i>]anthracène	2A	0.1
Chrysène	3	0.01
Benzo[<i>b</i>]fluoranthène	2B	0.1
Benzo[<i>k</i>]fluoranthène	2B	0.1
Benzo[<i>a</i>]pyrène	2A	1
Dibenzo[<i>a,h</i>]anthracène	2A	1
Benzo[<i>g,h,i</i>]pérylène	3	0.01
Indéno[<i>1,2,3-cd</i>]pyrène	2B	0.1

ANNEXE 8 : IDENTIFICATION DES HAP DANS LES CAFES MOULUS DU COMMERCE PAR GC-MS/MS

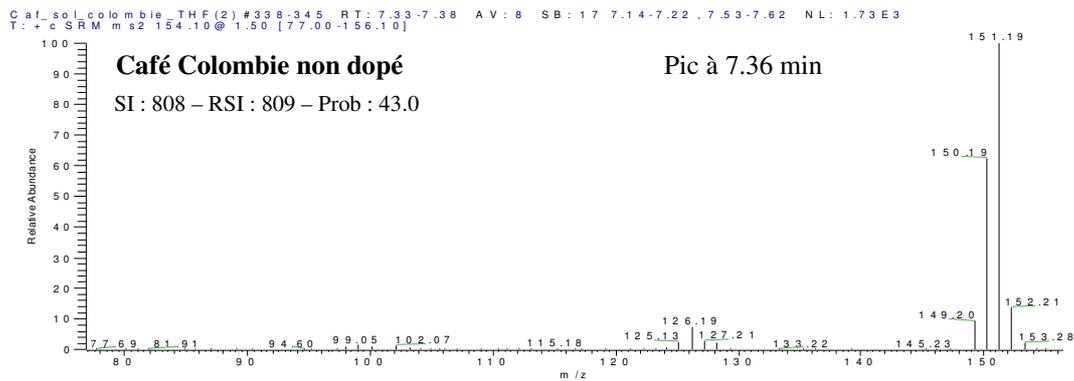
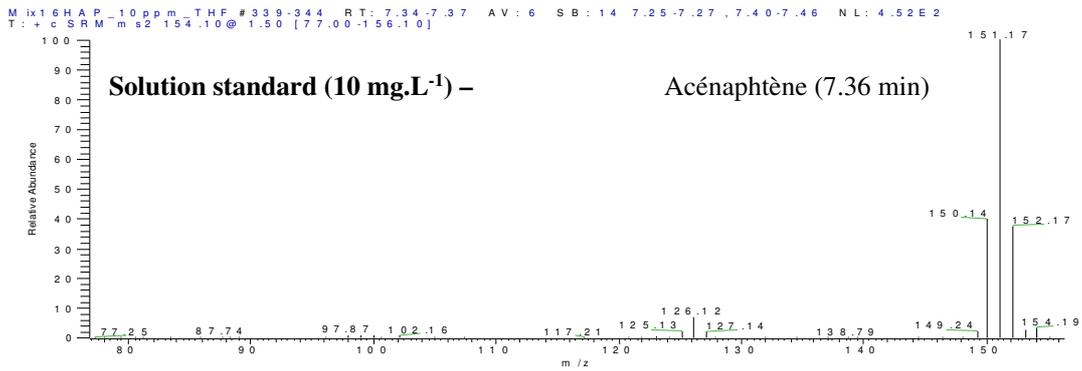
○ Identification du naphthalène



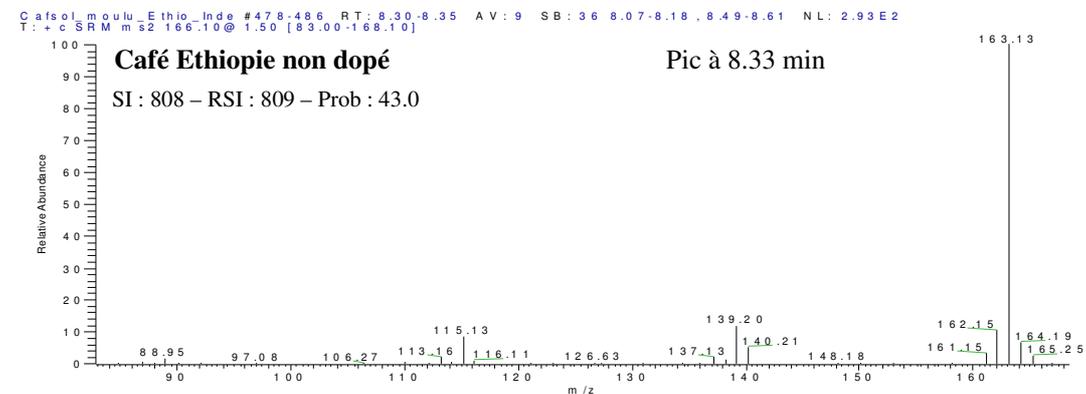
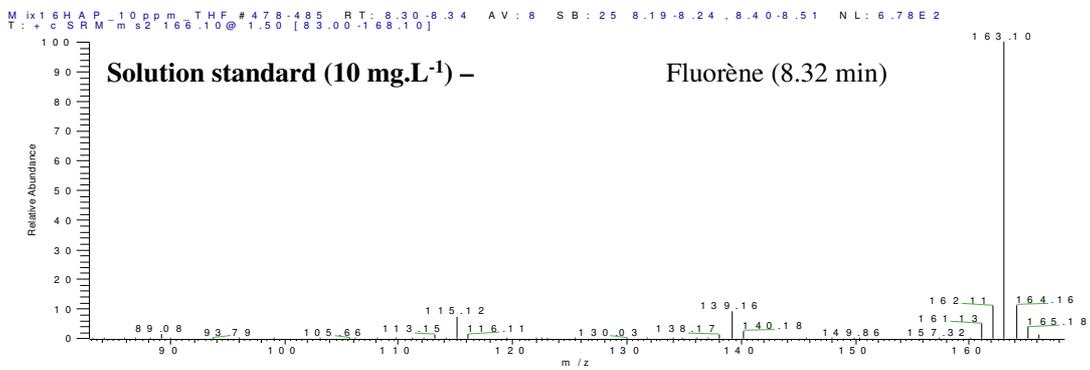
○ Identification de l'acénaphthylène



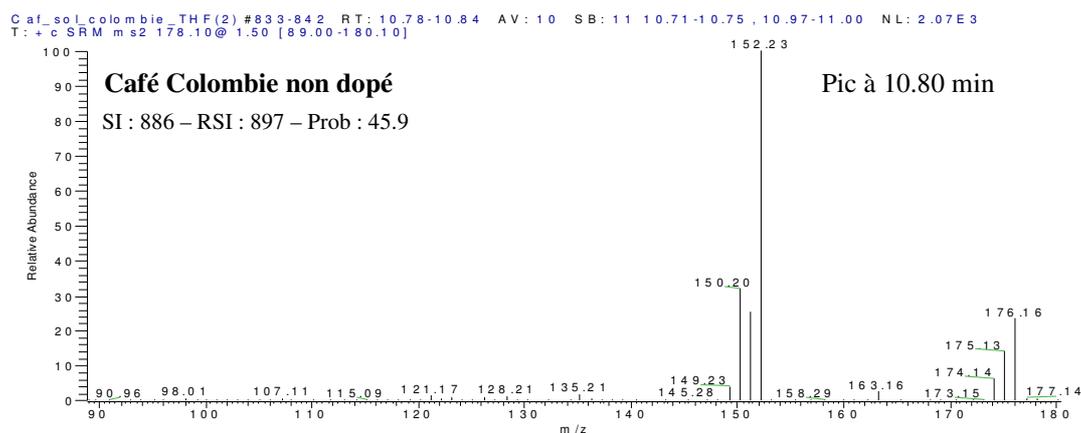
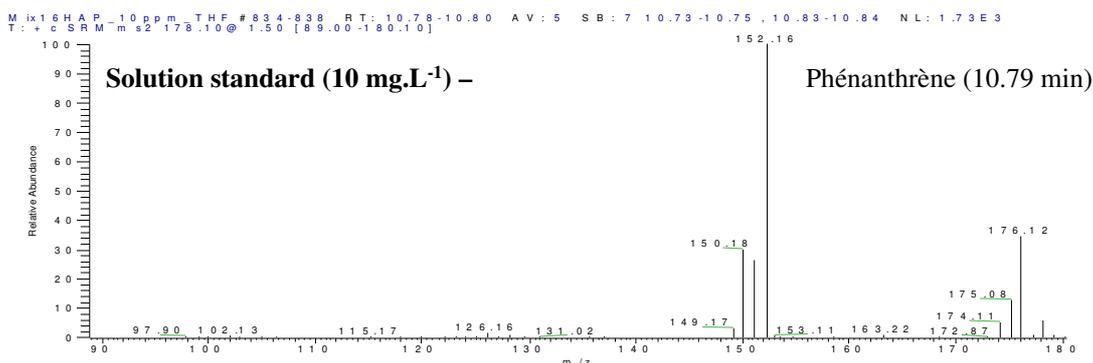
○ Identification de l'acénaphène



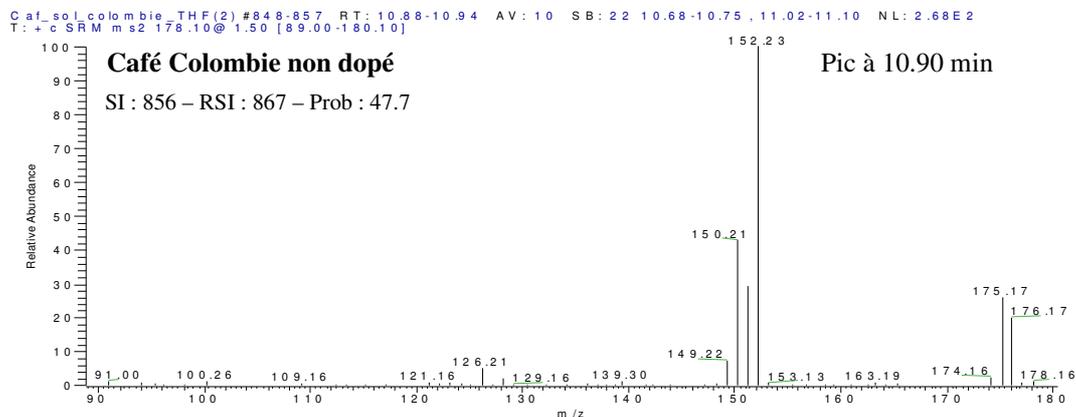
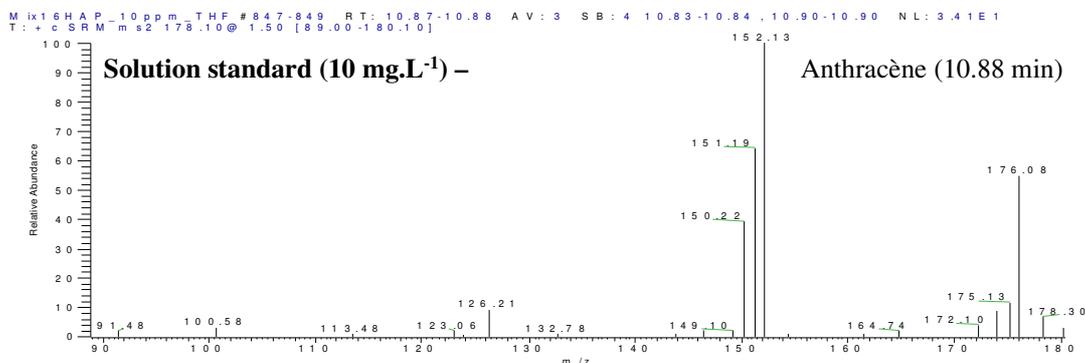
○ Identification du fluorène



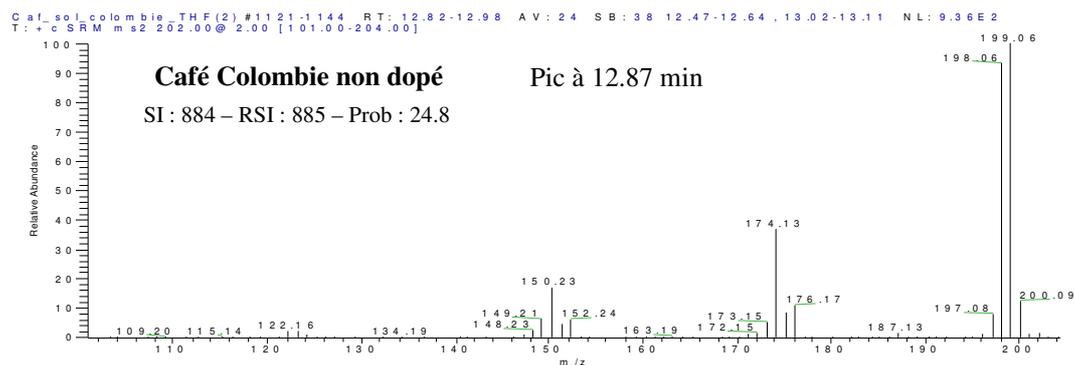
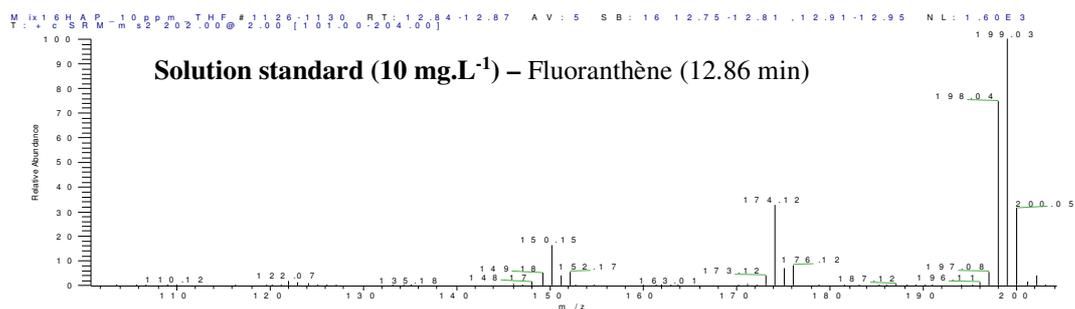
○ Identification du phénanthrène



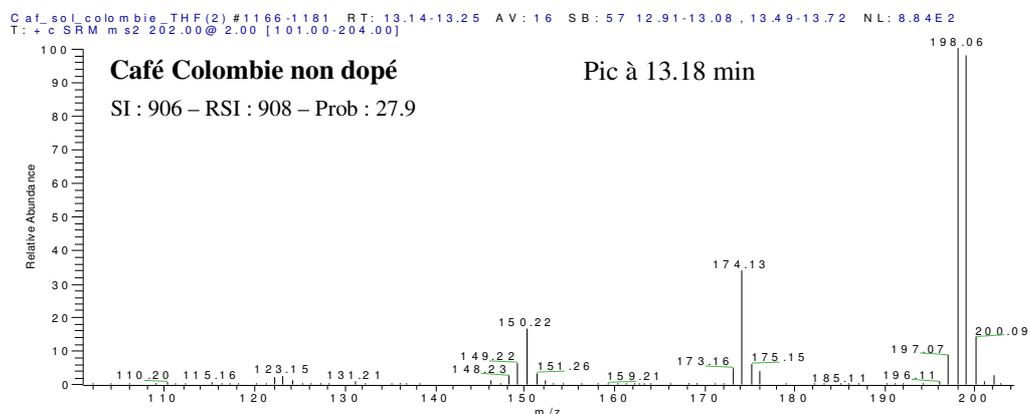
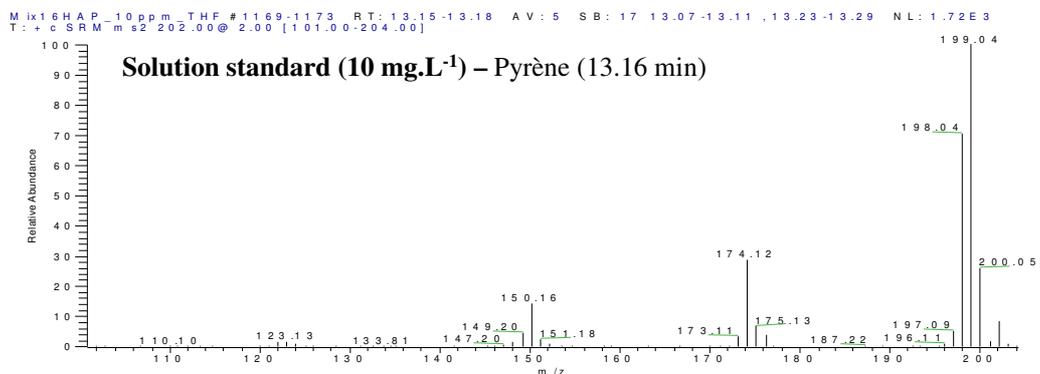
○ Identification de l'anthracène



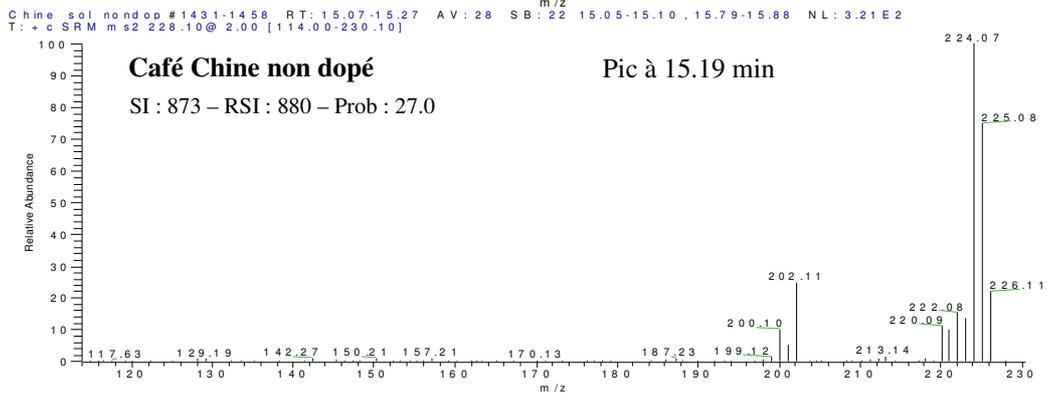
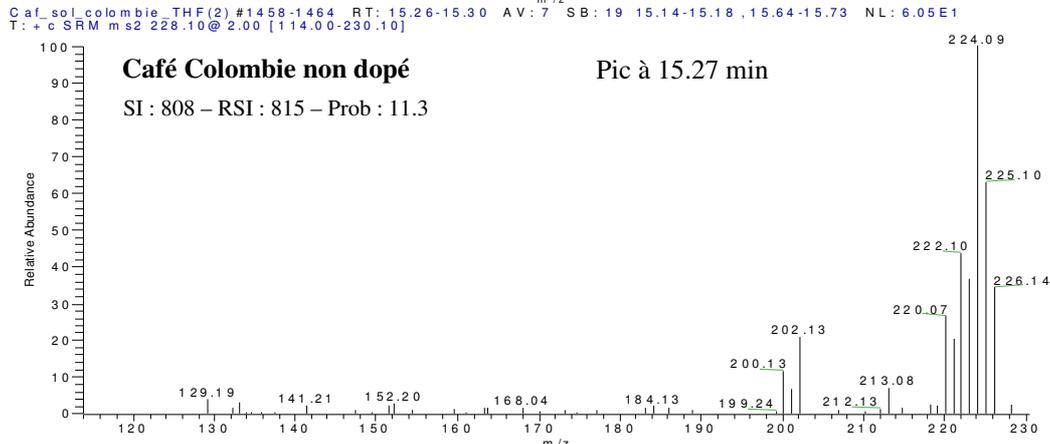
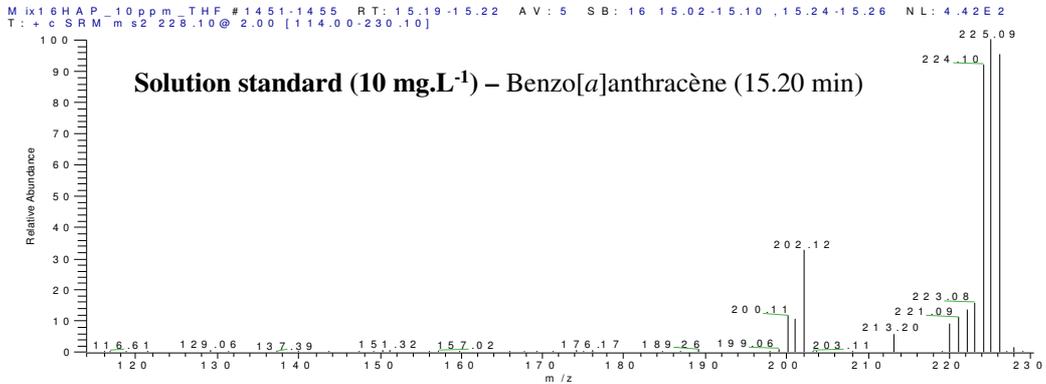
○ Identification du fluoranthène



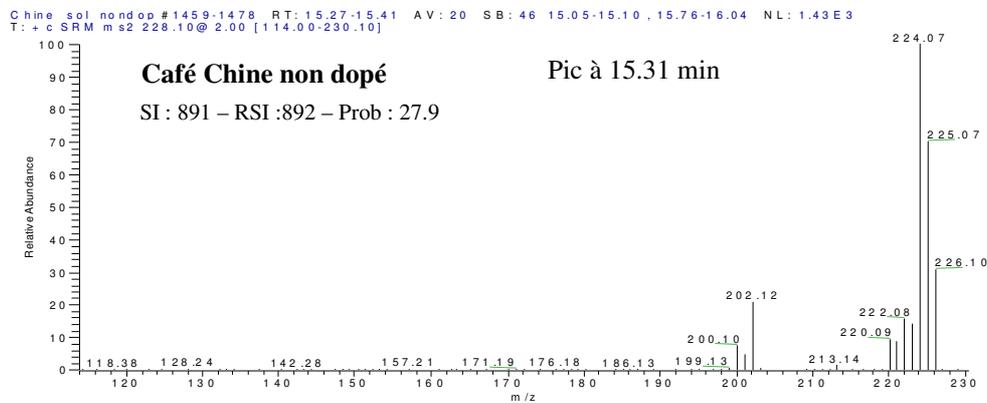
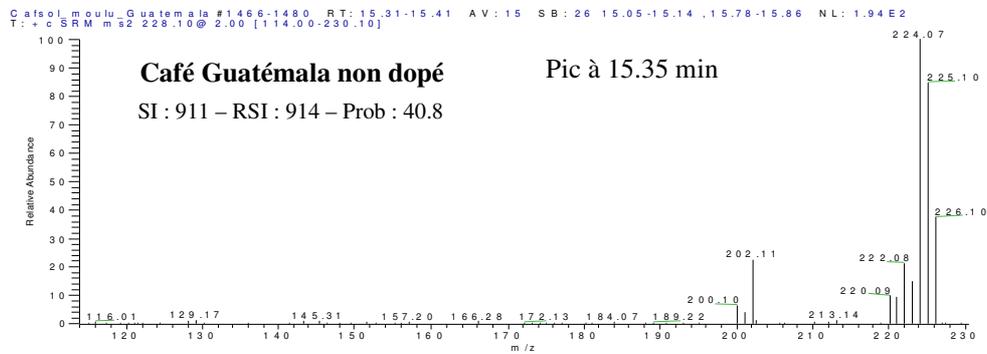
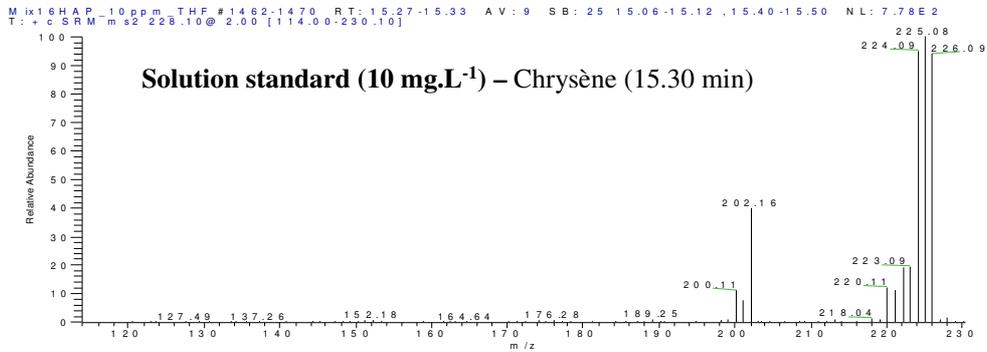
○ Identification du pyrène



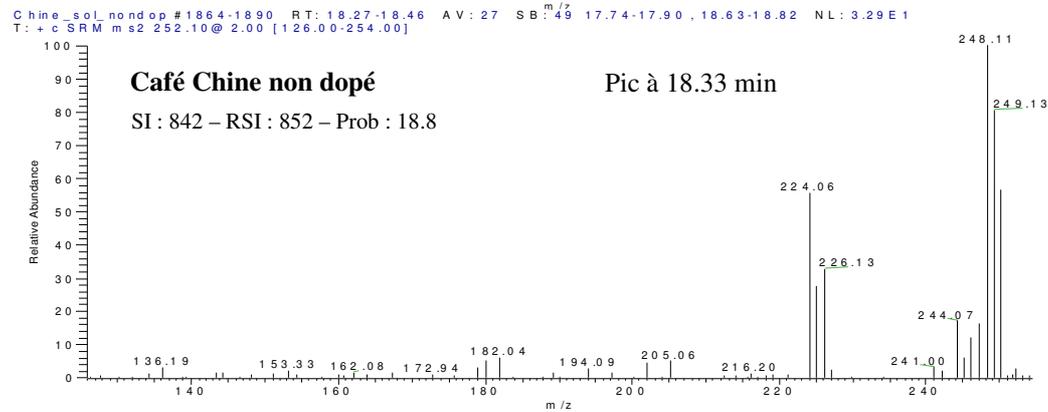
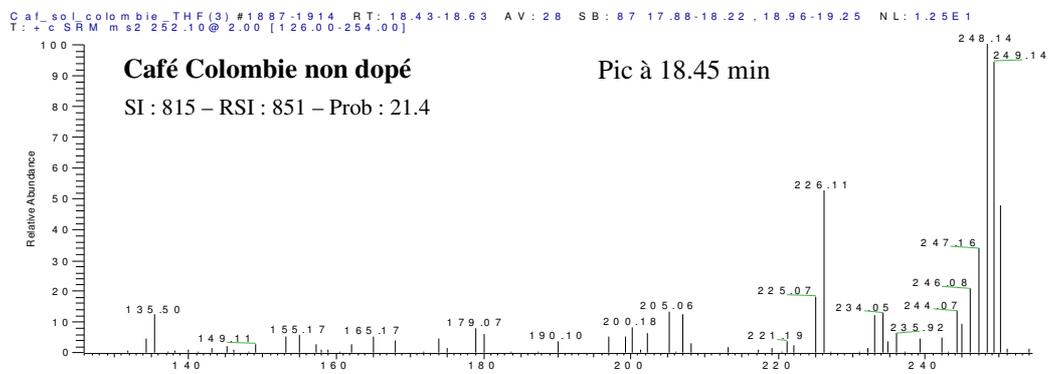
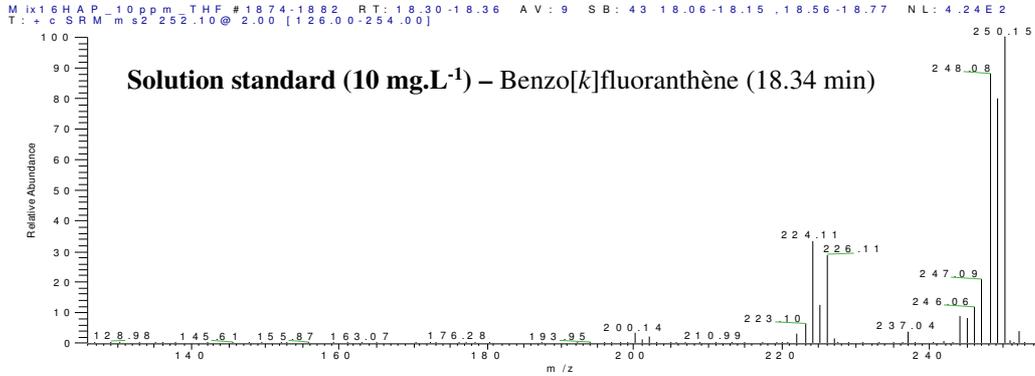
○ Identification du benzo[a]anthracène



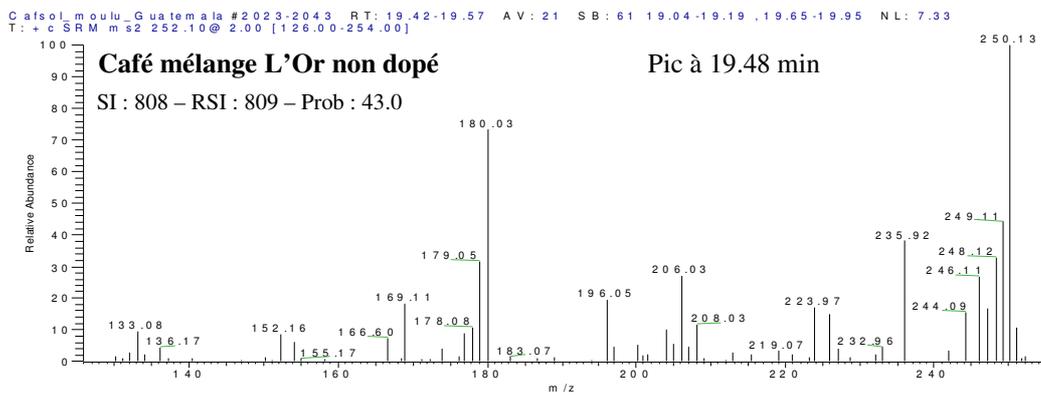
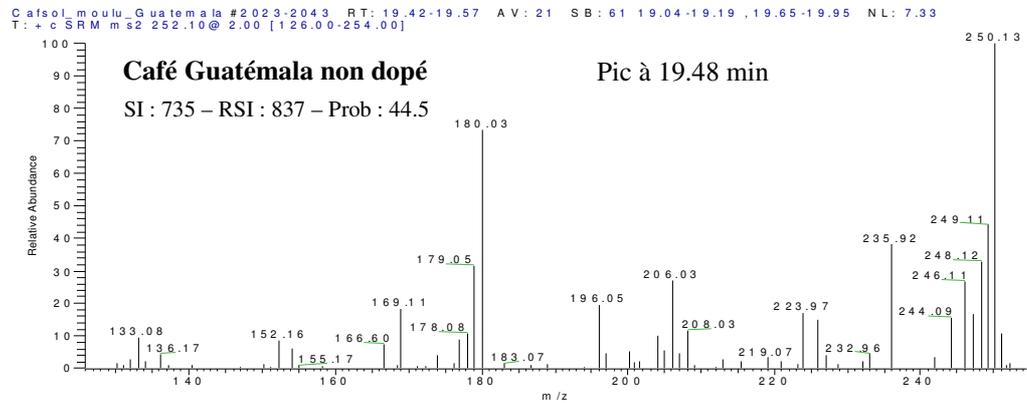
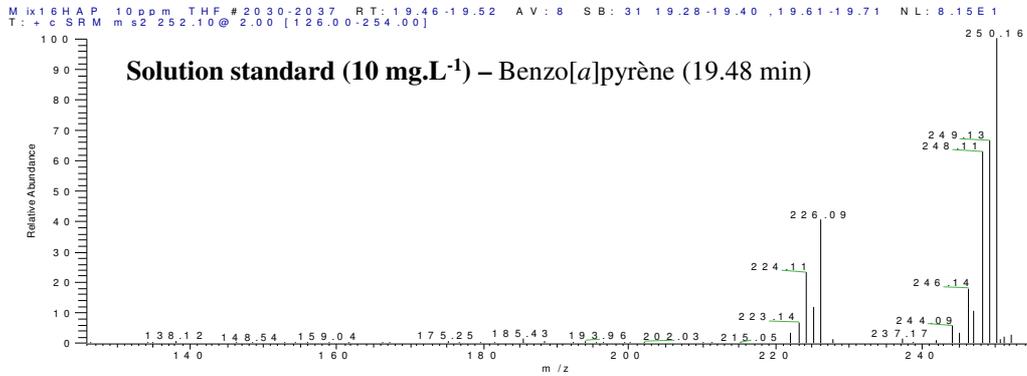
○ Identification du chrysène



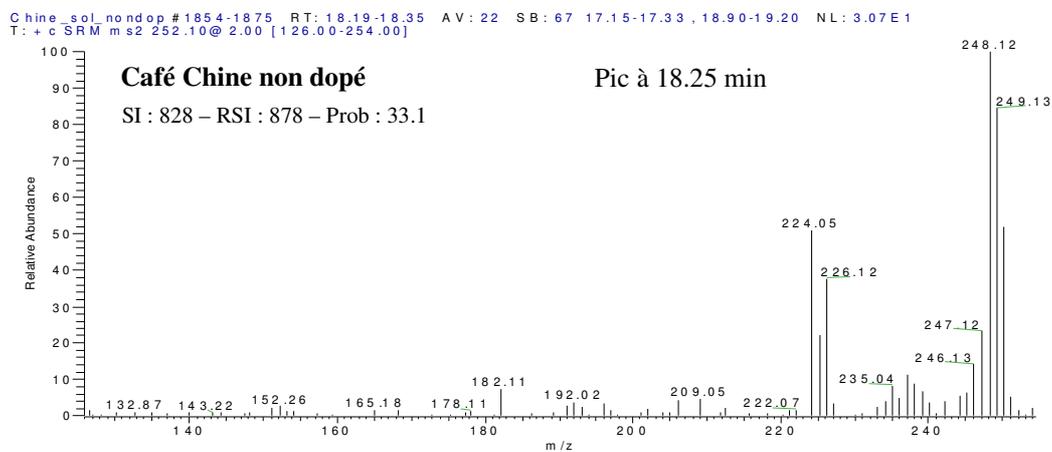
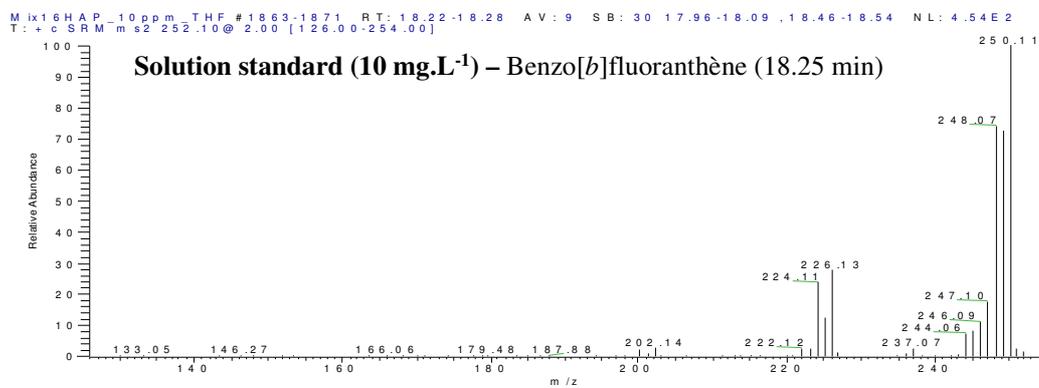
○ Identification du benzo[k]fluoranthène



○ Identification du benzo[a]pyrène



○ Identification du benzo[*b*]fluoranthène



ANNEXE 9 : ETUDE DE LA CINETIQUE DE FORMATION DES HAP

○ Simulations réalisés pour tester la validité de l'hypothèse H4

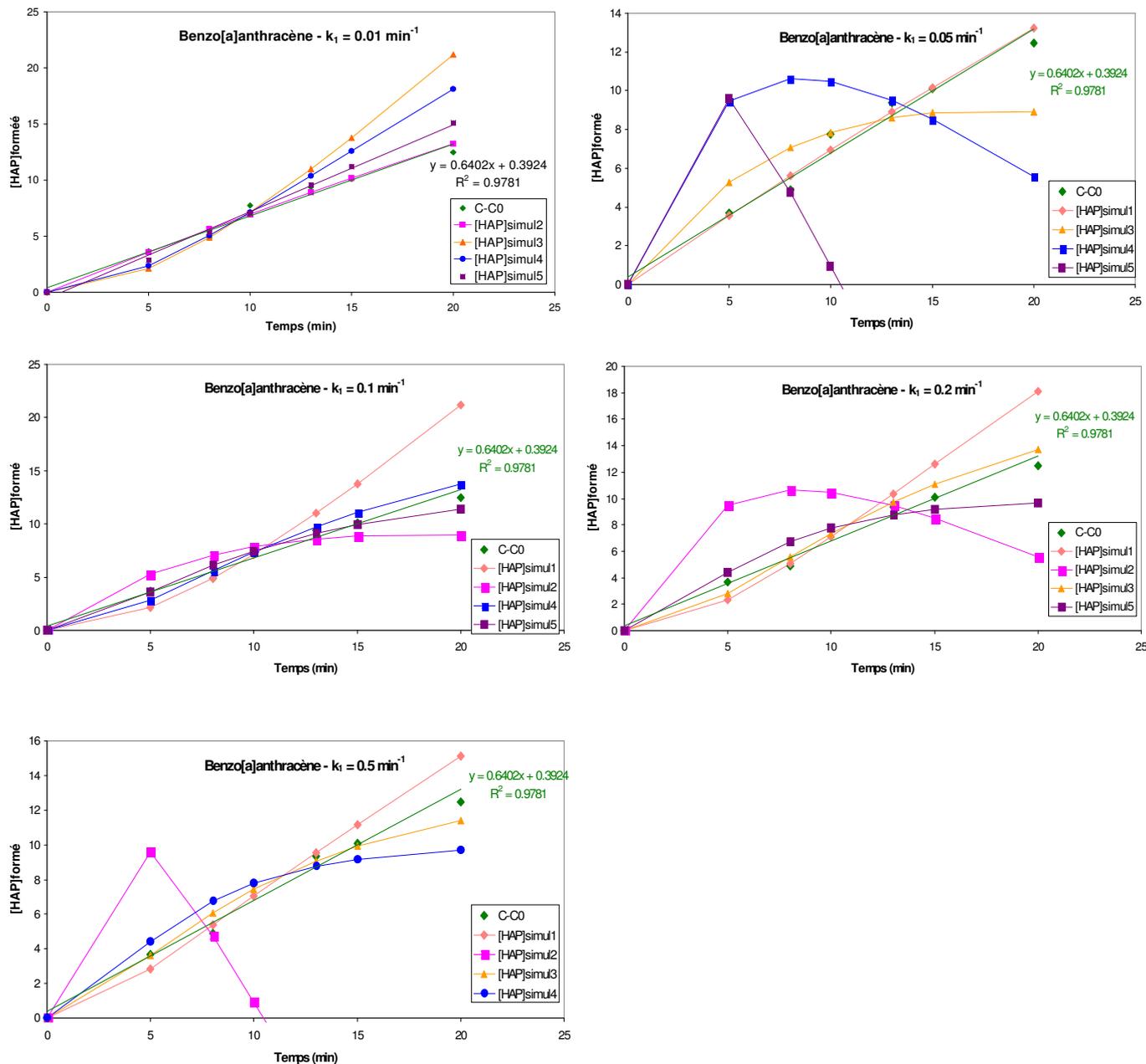


Figure 1 : Comparaison de données simulées avec les résultats expérimentaux pour le benzo[a]anthracène (à 260°C). Simulation 1 : $k_2 = 0.01 \text{ min}^{-1}$; Simulation 2 : $k_2 = 0.05 \text{ min}^{-1}$; Simulation 3 : $k_2 = 0.1 \text{ min}^{-1}$; Simulation 4 : $k_2 = 0.2 \text{ min}^{-1}$; Simulation 5 : $k_2 = 0.5 \text{ min}^{-1}$;

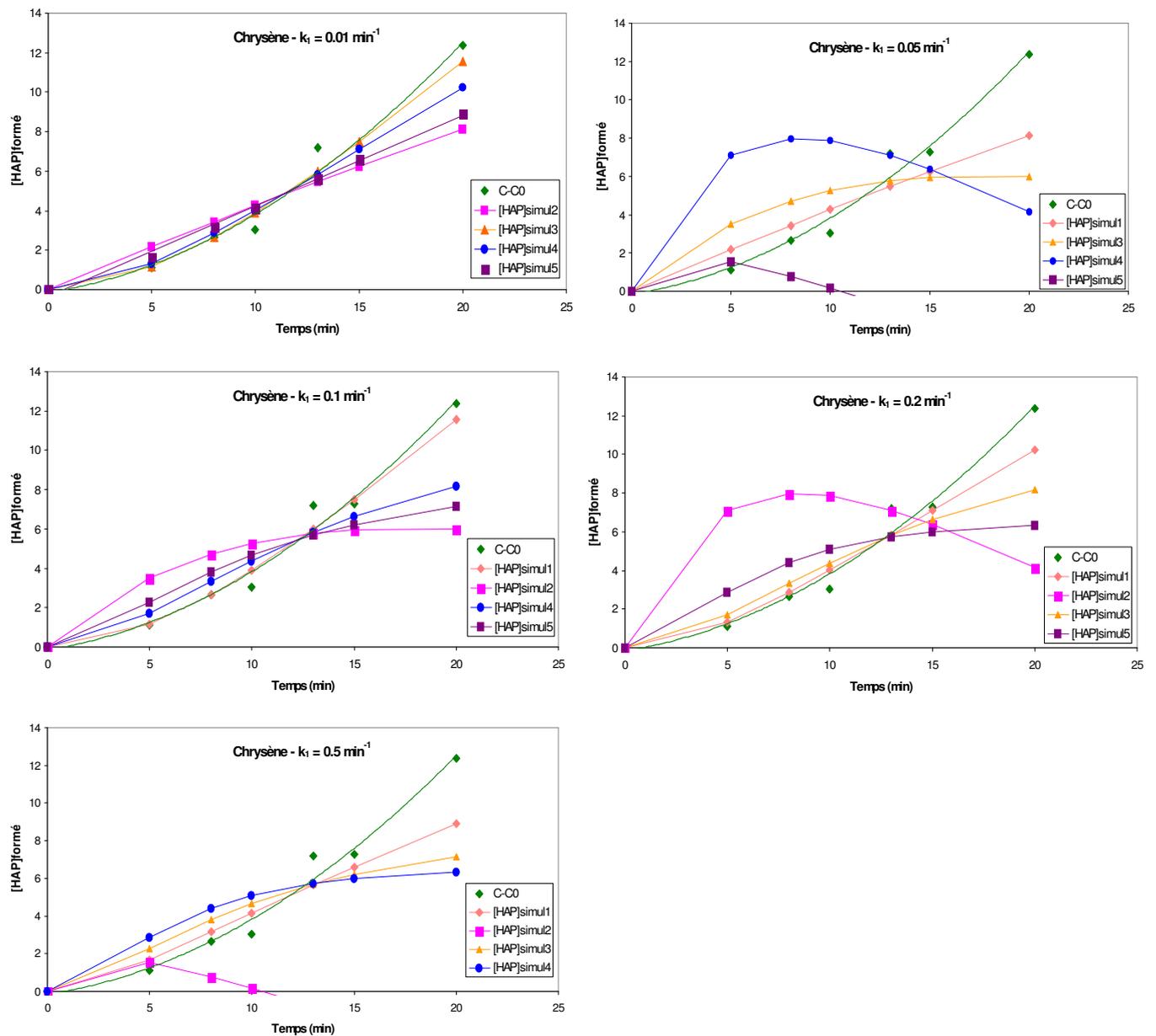


Figure 2 : Comparaison de données simulées avec les résultats expérimentaux pour le chrysène (à 260°C). Simulation 1 : $k_2 = 0.01 \text{ min}^{-1}$; Simulation 2 : $k_2 = 0.05 \text{ min}^{-1}$; Simulation 3 : $k_2 = 0.1 \text{ min}^{-1}$; Simulation 4 : $k_2 = 0.2 \text{ min}^{-1}$; Simulation 5 : $k_2 = 0.5 \text{ min}^{-1}$;

○ Tracé des courbes $1/[HAP] = f(1/t)$ pour tester la validité de l'hypothèse H3

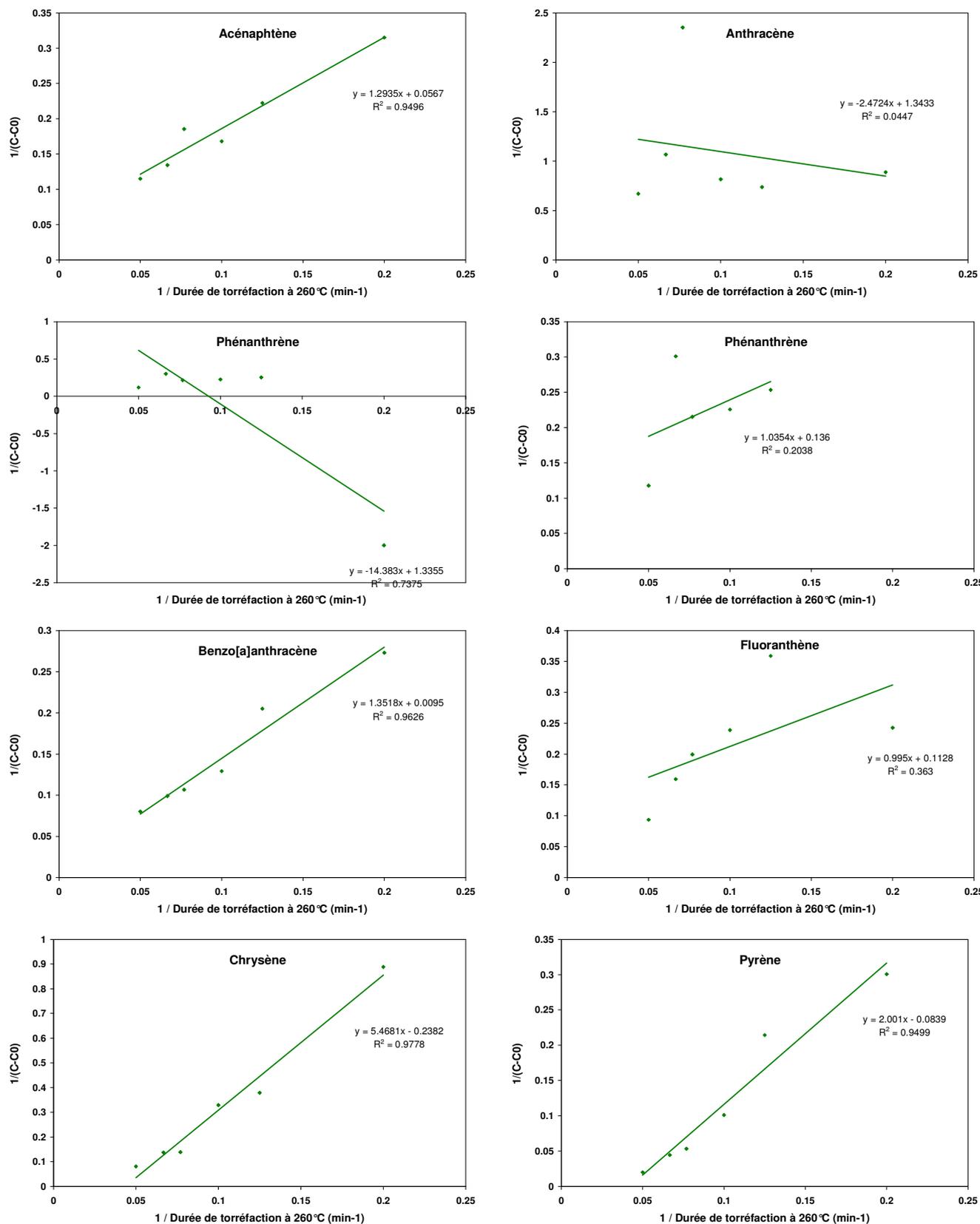


Figure 3 : Corrélations obtenues entre $1/[HAP]$ et $1/t$ pour divers HAP à 260°C .

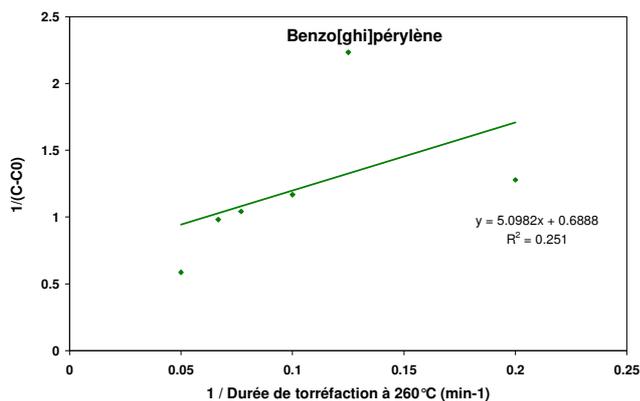
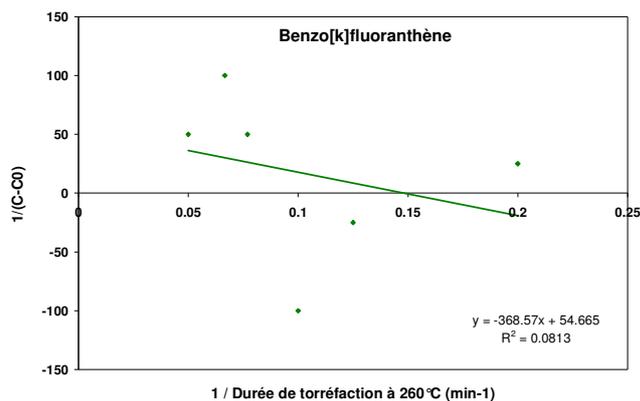


Figure 3 (suite) : Corrélations obtenues entre $1/[HAP]$ et $1/t$ pour divers HAP à 260°C .

○ Estimation des constantes de vitesse à diverses températures en supposant l'hypothèse H1 valide

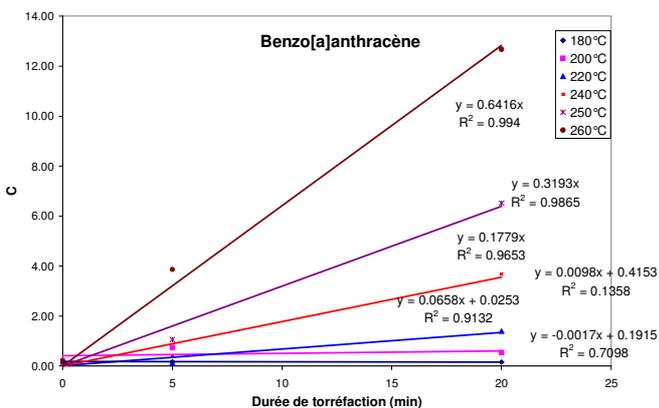
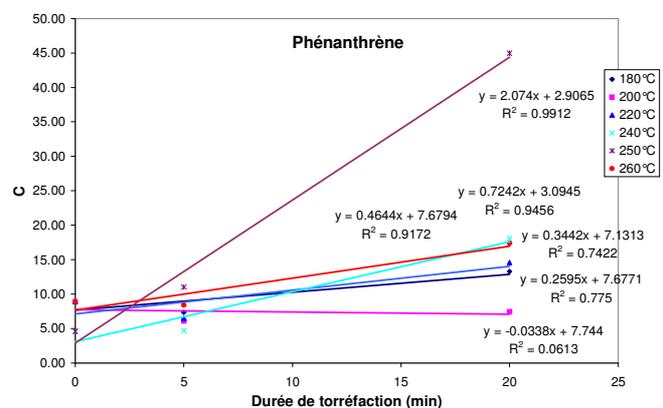
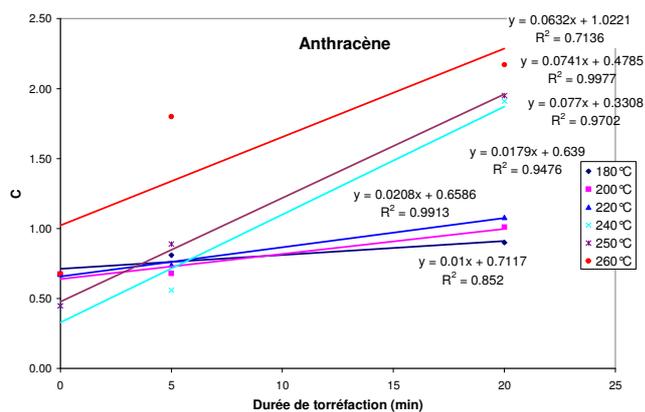
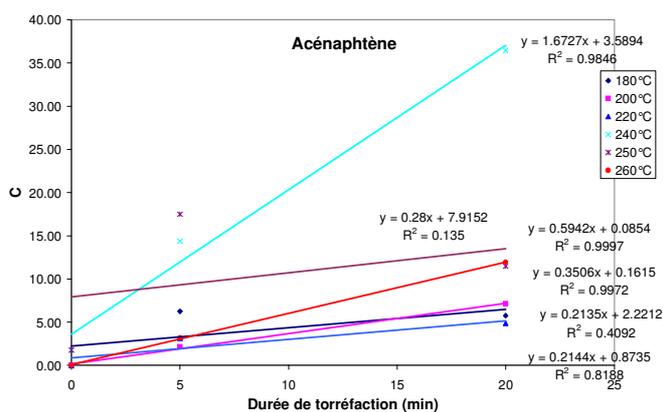


Figure 4 : Evolution des concentrations estimées pour chaque HAP en fonction de la durée et de la température de torréfaction .

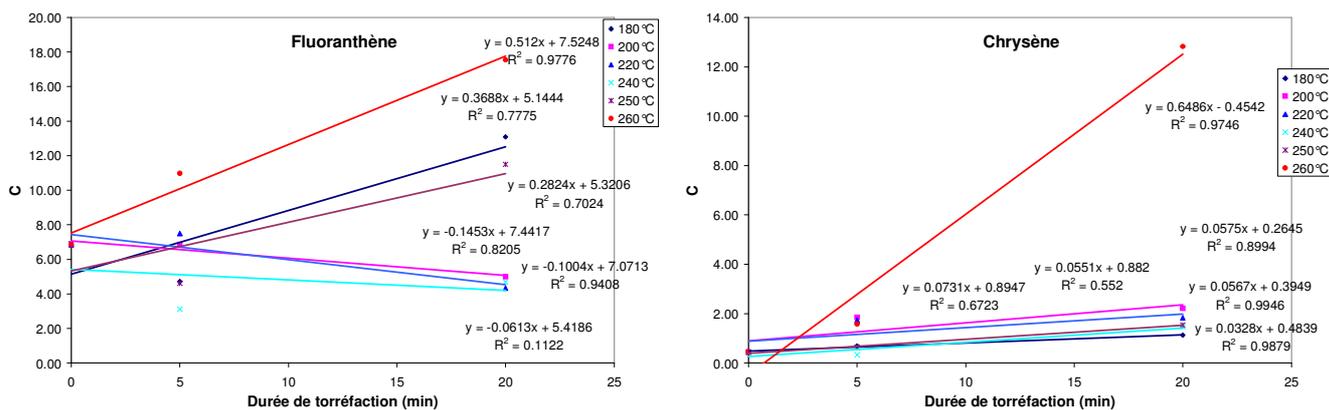


Figure 4 (suite) : Evolution des concentrations estimées pour chaque HAP en fonction de la durée et de la température de torréfaction .

Tableau 1 : Constantes de vitesse estimées pour la formation des HAP analysés dans les échantillons de café torréfiés à différentes températures de l'air entrant (le benzo[ghi]pérylène n'y figure pas puisque ce composé n'a pu être détecté pour les températures inférieures à 260°C).

Composés	Nombre de cycles	Ordre de la réaction	k_2 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)					
			180°C	200°C	220°C	240°C	250°C	260°C
Acénaphène	3	0	0.2135	0.3506	0.2144	1.6727	0.2800	0.5942
Anthracène	3	0	0.0100	0.0179	0.0208	0.0770	0.0741	0.0632
Phénanthrène	3	0	0.2595	---	0.3442	0.7242	2.074	0.4644
Benzo[a]anthracène	4	0	---	0.0098	0.0658	0.1779	0.3193	0.6416
Fluoranthène	4	0	0.3688	---	---	---	0.2824	0.512
Chrysène	4	0	0.0328	0.0731	0.0551	0.0575	0.0567	0.6486

○ Estimation des énergies d'activation (loi d'Arrhénius)

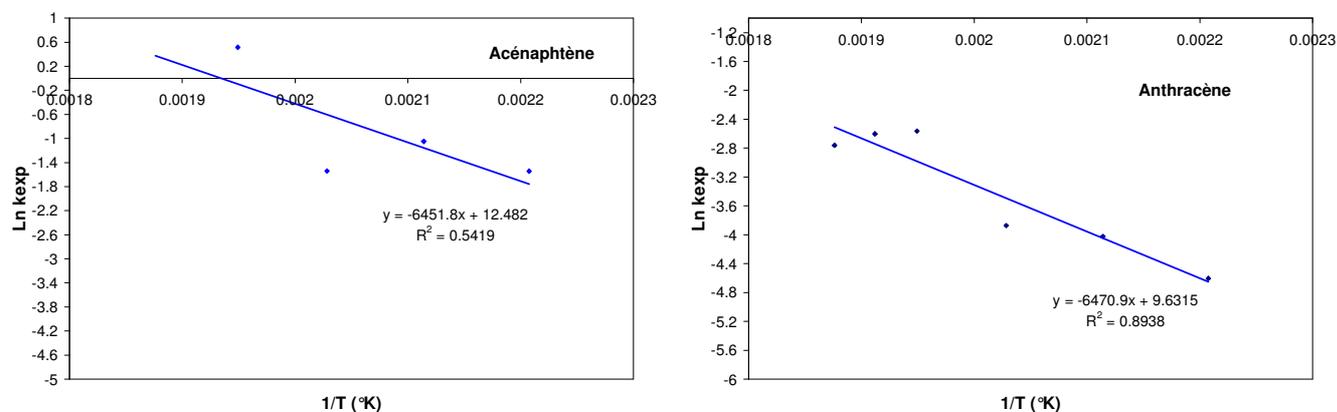


Figure 5 : Corrélation obtenues entre $\text{Ln } k_{\text{exp}}$ et $1/T$ pour divers HAP en supposant une cinétique de formation d'ordre 0 (pour l'acénaphène et le phénanthrène, seules les valeurs jusqu'à 240 et 250°C ont été considérées respectivement, puisqu'au-delà de ces températures il semble qu'une partie du composé formé se dégrade).

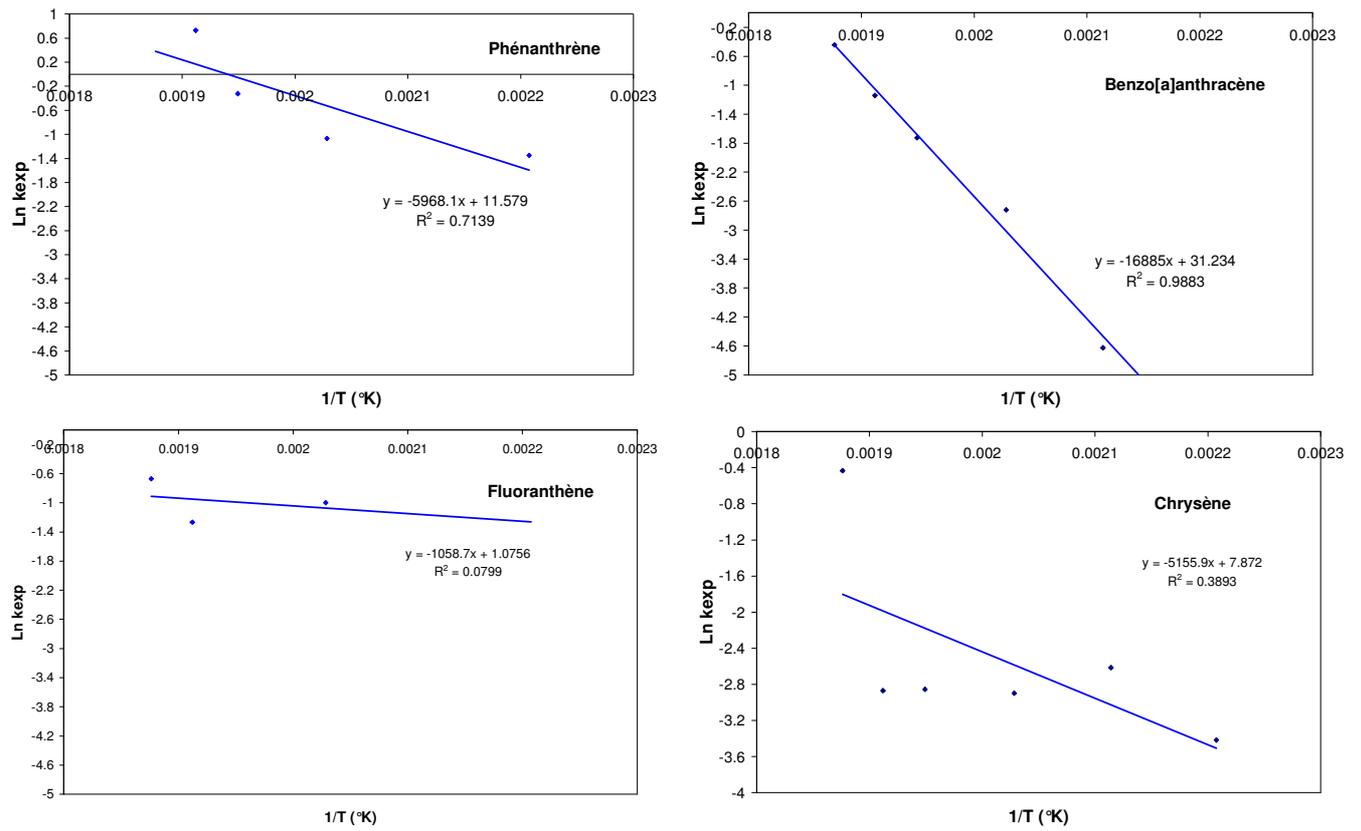
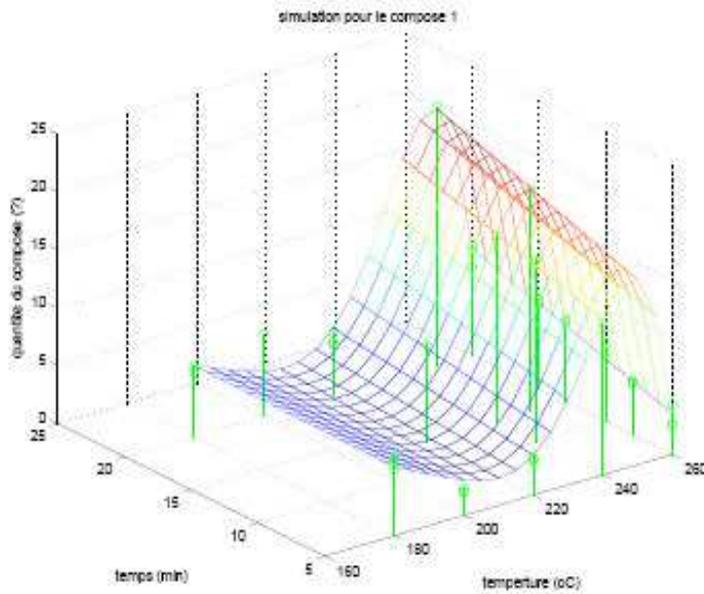


Figure 5 (suite): Corrélation obtenues entre $\ln k$ et $1/T$ pour divers HAP en supposant une cinétique de formation d'ordre 0 (pour l'acénaphthène et le phénanthrène, seules les valeurs jusqu'à 240 et 250°C ont été considérées respectivement, puisqu'au-delà de ces températures il semble qu'une partie du composé formé se dégrade).

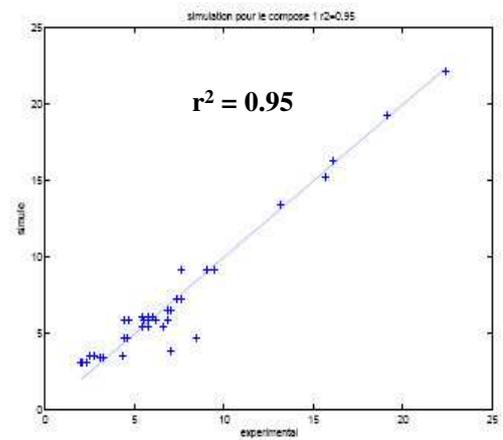
ANNEXE 10 : MODELISATION DE LA FORMATION DES HAP A L'AIDE D'UN RESEAU DE NEURONES

○ Résultats pour l'acénaphène

Simulation pour l'acénaphène

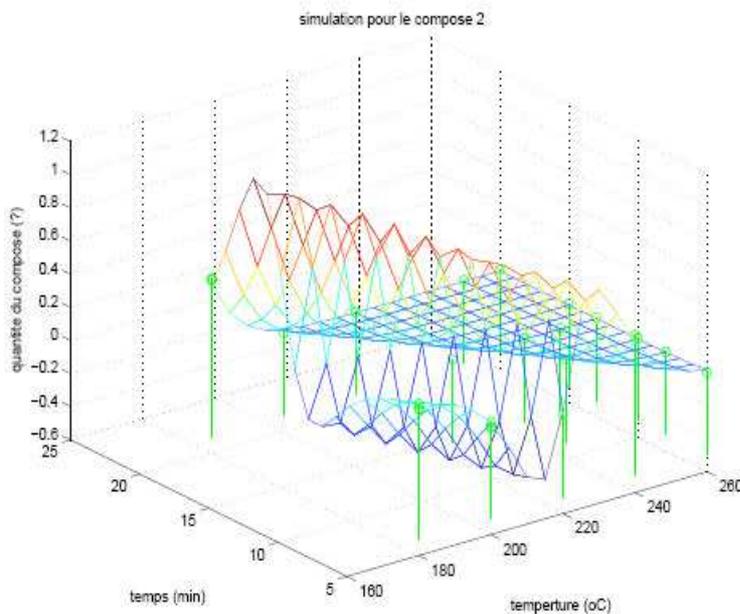


Corrélogramme de l'acénaphène

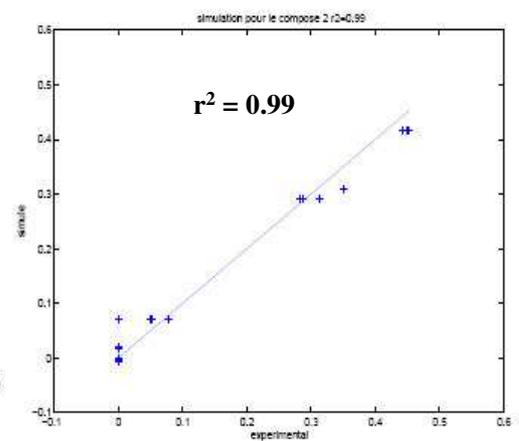


○ Résultats pour le fluorène

Simulation pour le fluorène

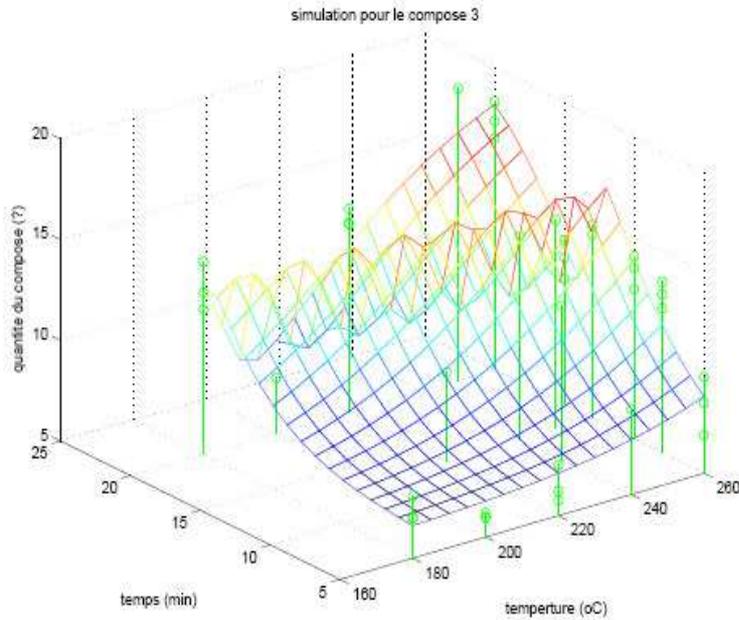


Corrélogramme du fluorène

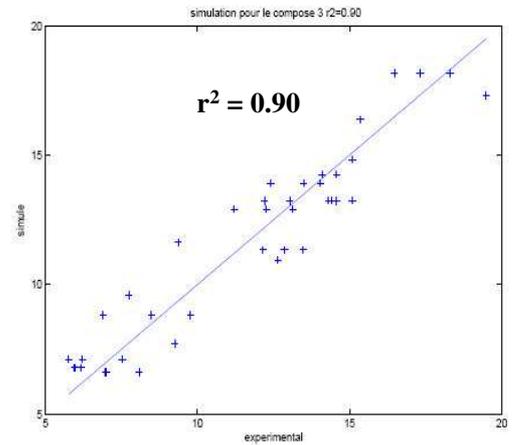


○ Résultats pour le phénanthrène

Simulation pour le phénanthrène

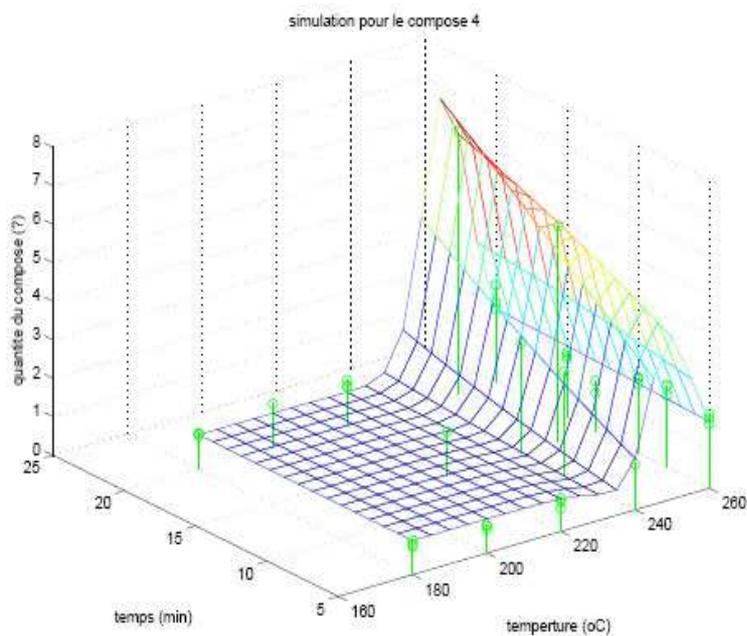


Corrélogramme du phénanthrène

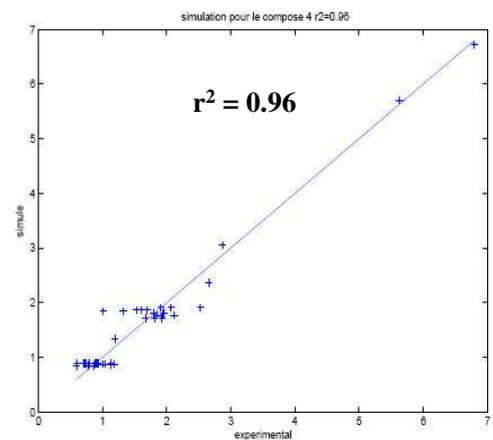


○ Résultats pour l'anthracène

Simulation pour l'anthracène

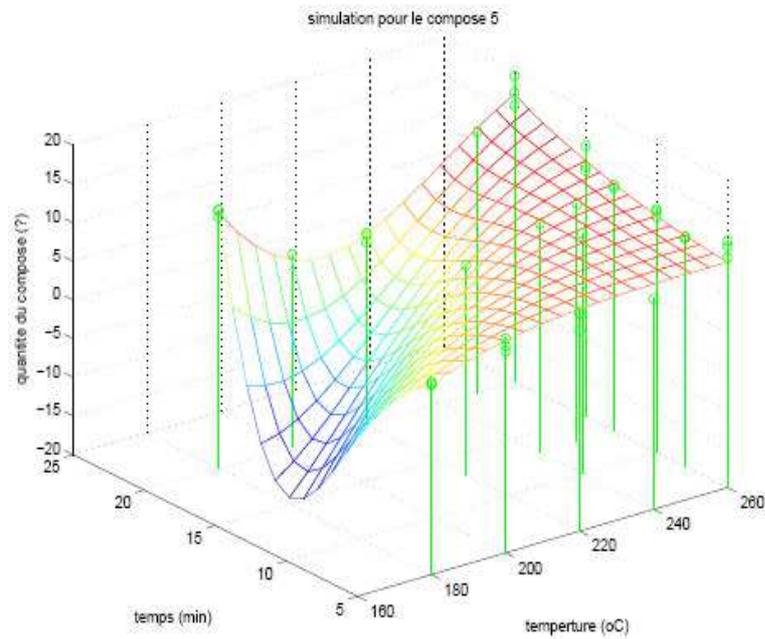


Corrélogramme de l'anthracène

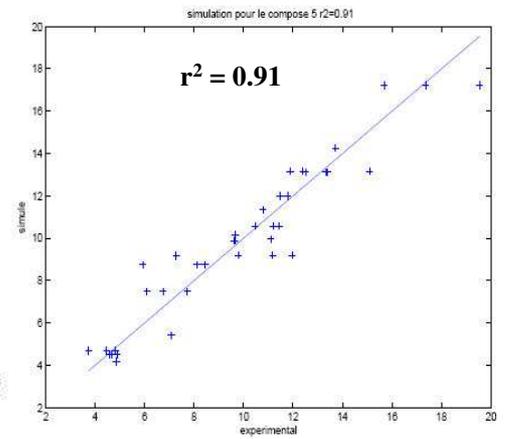


○ Résultats pour le fluoranthène

Simulation pour le fluoranthène

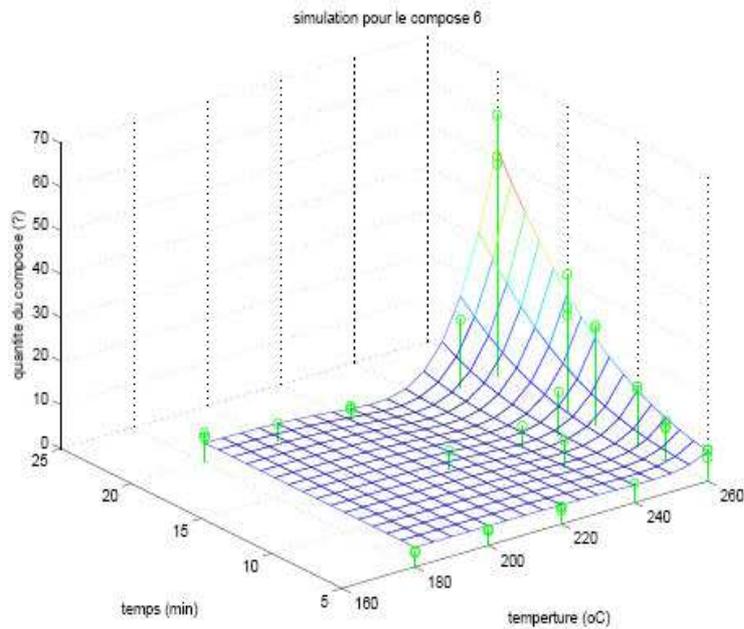


Corrélogramme du fluoranthène

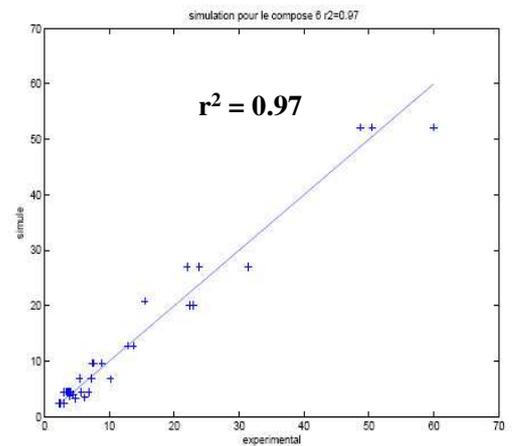


○ Résultats pour le pyrène

Simulation pour le pyrène

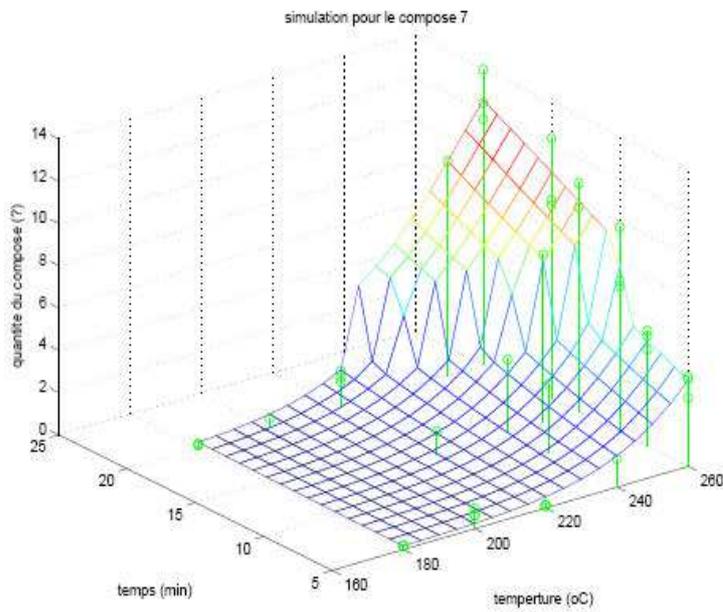


Corrélogramme du pyrène

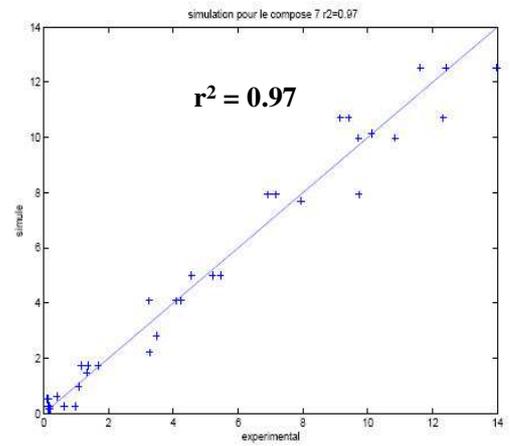


○ Résultats pour le benzo[a]anthracène

Simulation pour le benzo[a]anthracène

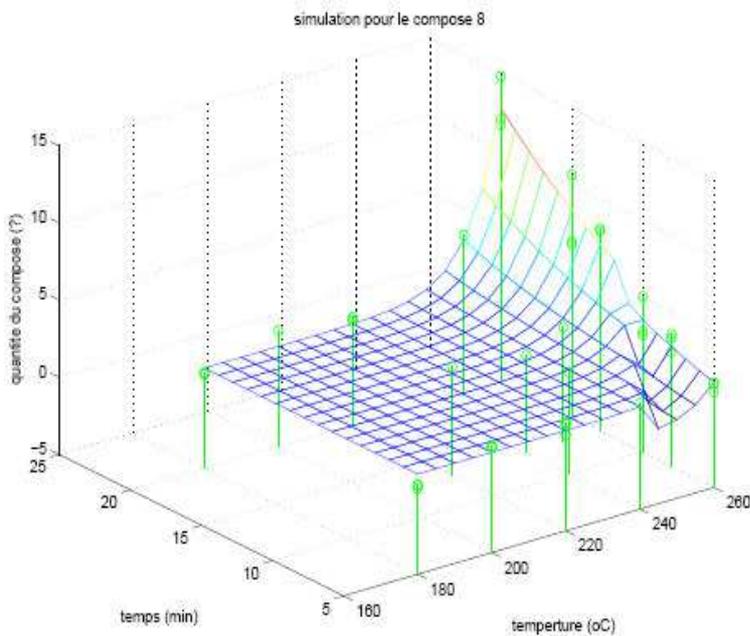


Corrélogramme du benzo[a]anthracène

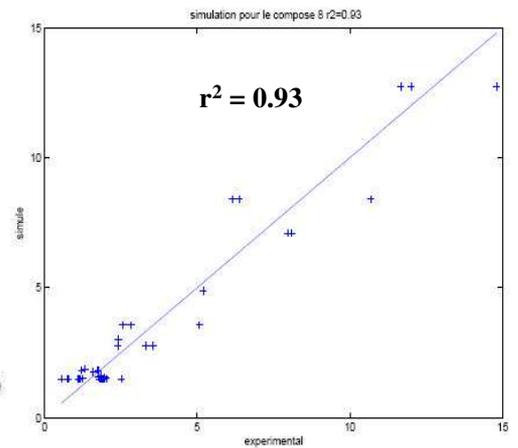


○ Résultats pour le chrysène

Simulation pour le chrysène

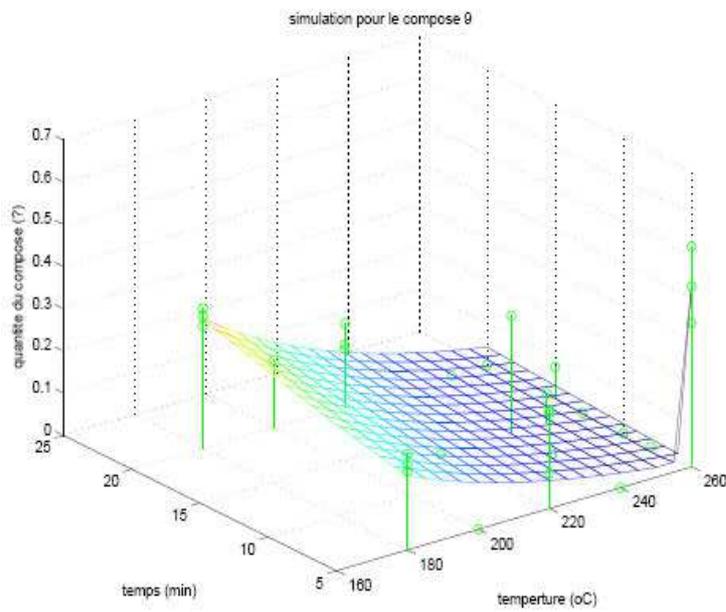


Corrélogramme du chrysène

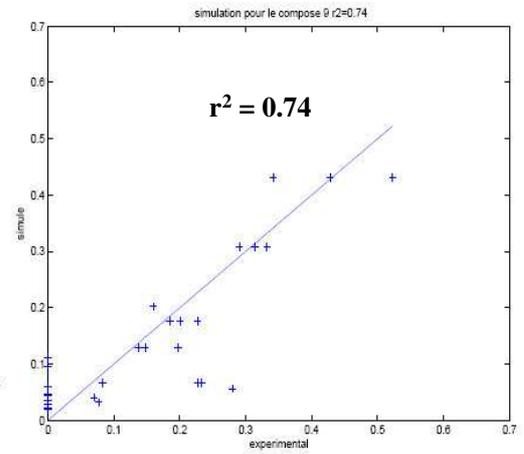


○ Résultats pour le benzo[*b*]fluoranthène

Simulation pour le benzo[*b*]fluoranthène

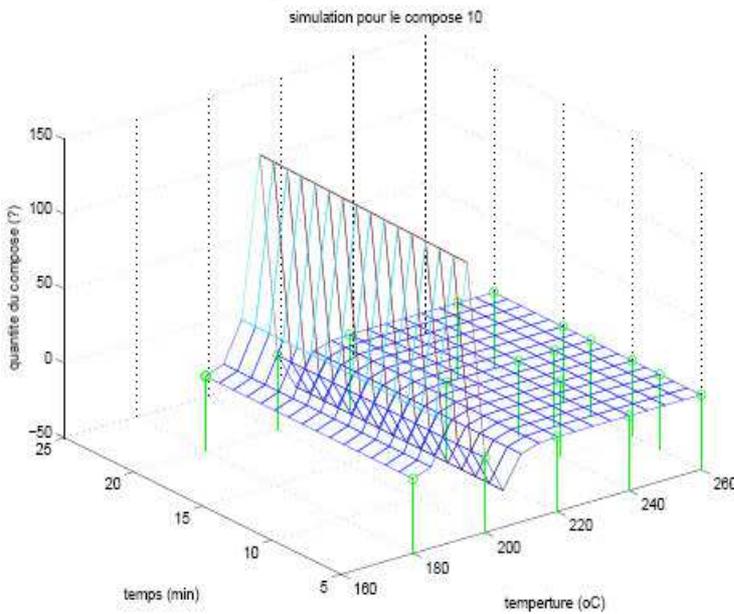


Corrélogramme du benzo[*b*]fluoranthène

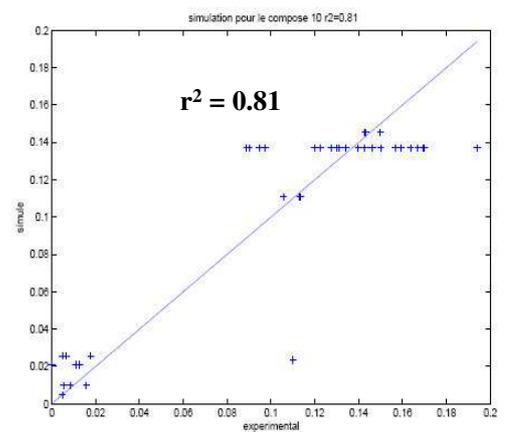


○ Résultats pour le benzo[*k*]fluoranthène

Simulation pour le benzo[*k*]fluoranthène

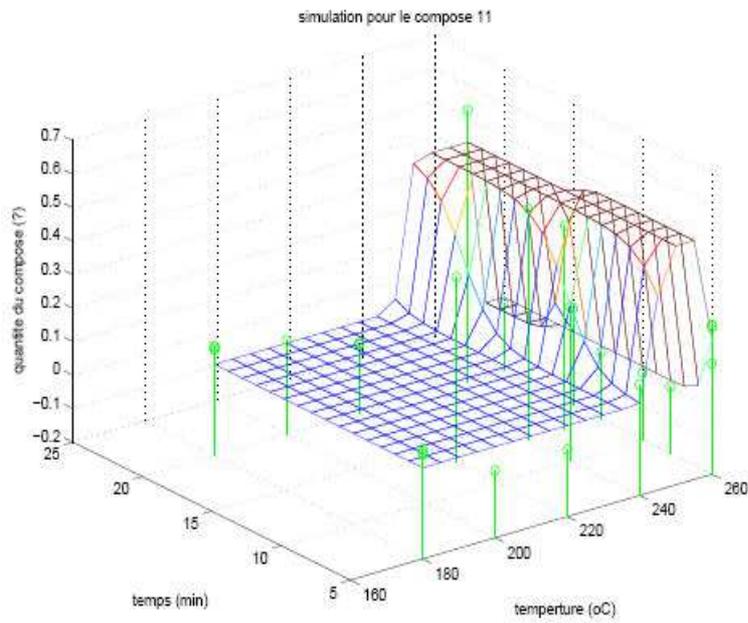


Corrélogramme du benzo[*k*]fluoranthène

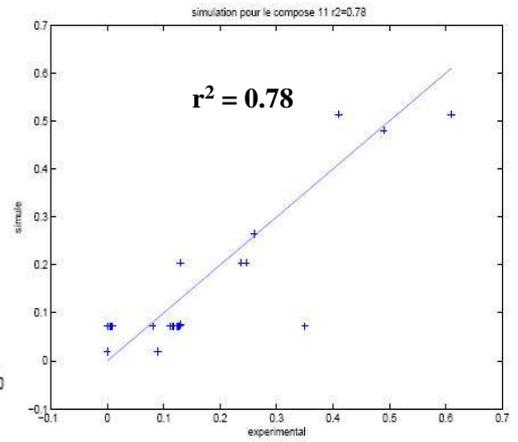


○ Résultats pour le benzo[a]pyrène

Simulation pour le benzo[a]pyrène

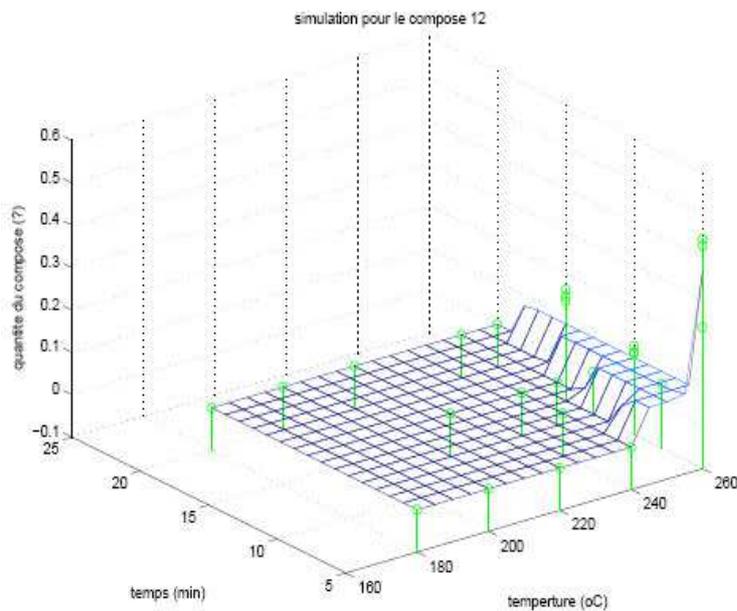


Corrélogramme du benzo[a]pyrène

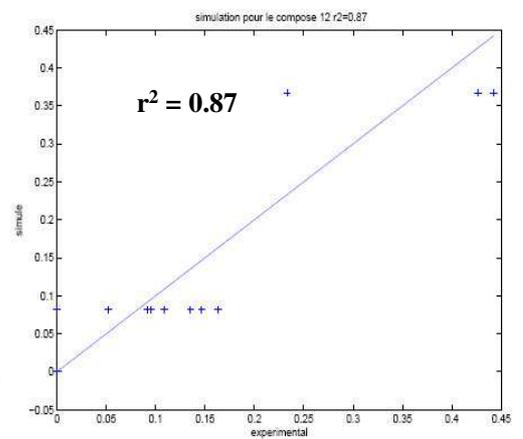


○ Résultats pour le dibenzo[a,h]anthracène

Simulation pour le dibenzo[a,h]anthracène

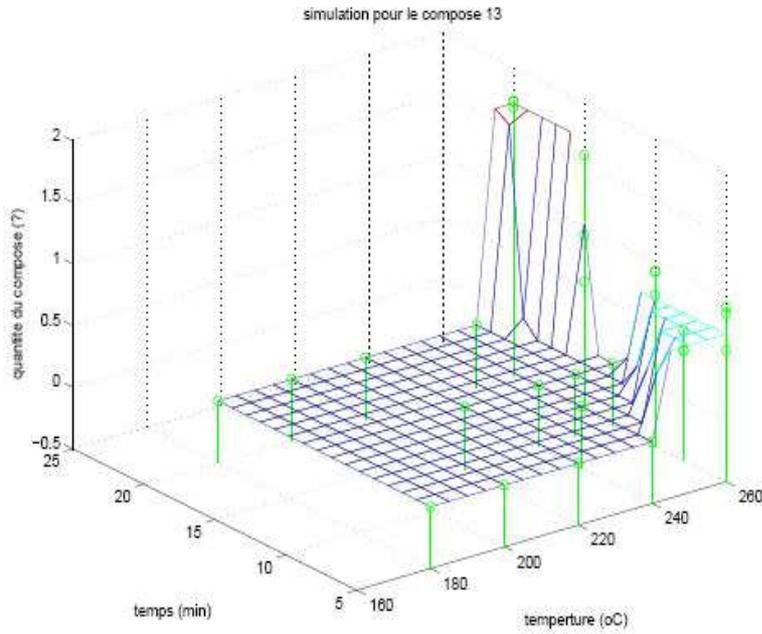


Corrélogramme du dibenzo[a,h]anthracène

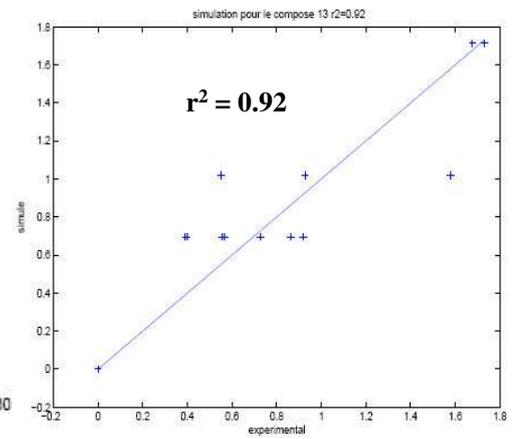


○ Résultats pour le benzo[*g,h,i*]pérylène

Simulation pour le benzo[*g,h,i*]pérylène

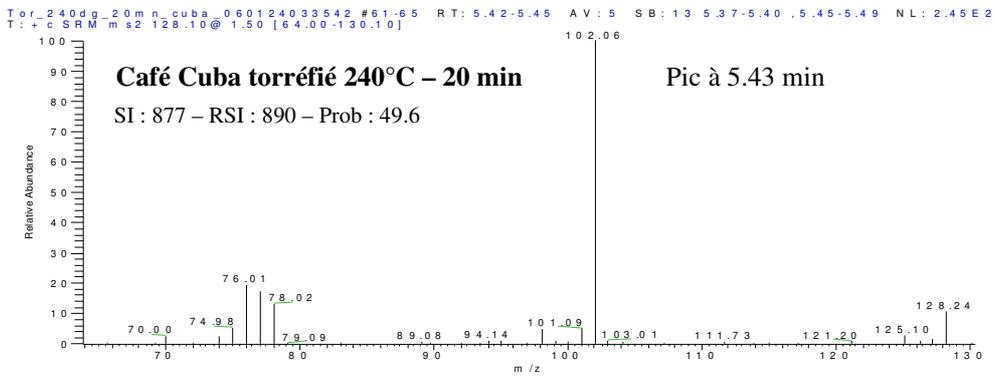
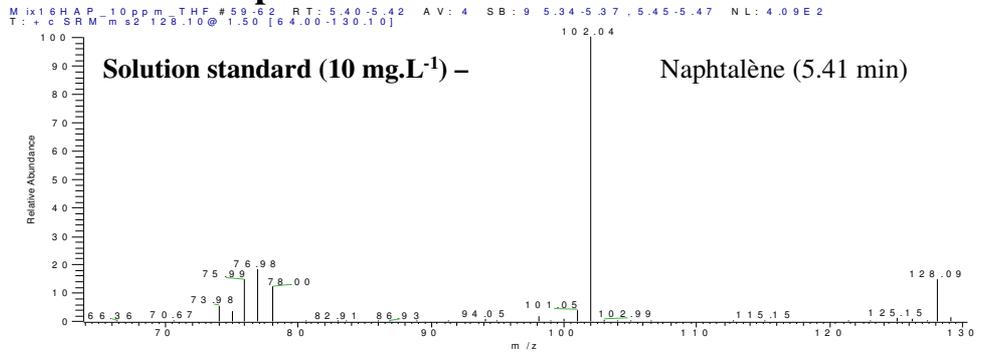


Corrélogramme du benzo[*g,h,i*]pérylène

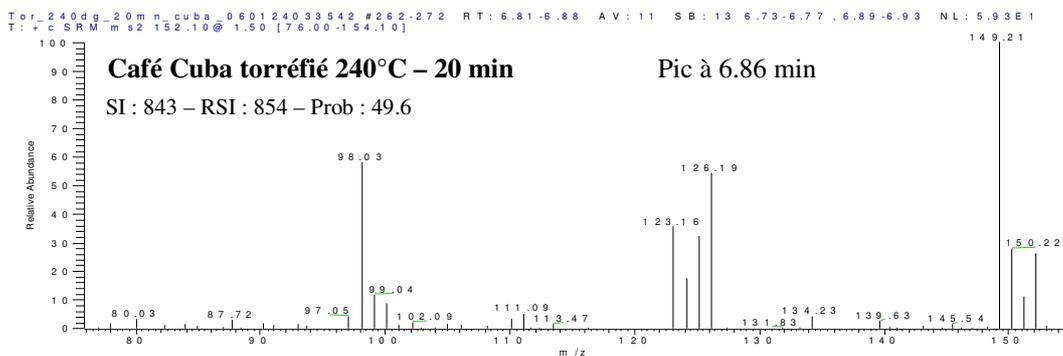
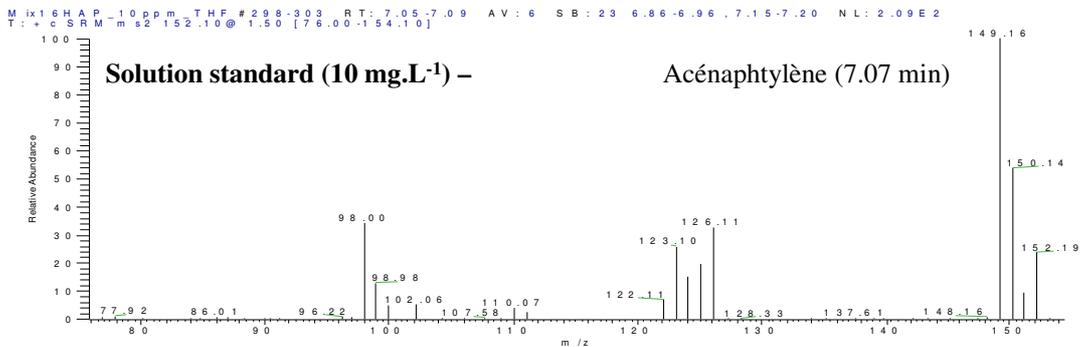


ANNEXE 11 : IDENTIFICATION DES HAP DANS LES CAFES MOULUS TORREFIES PAR GC-MS/MS

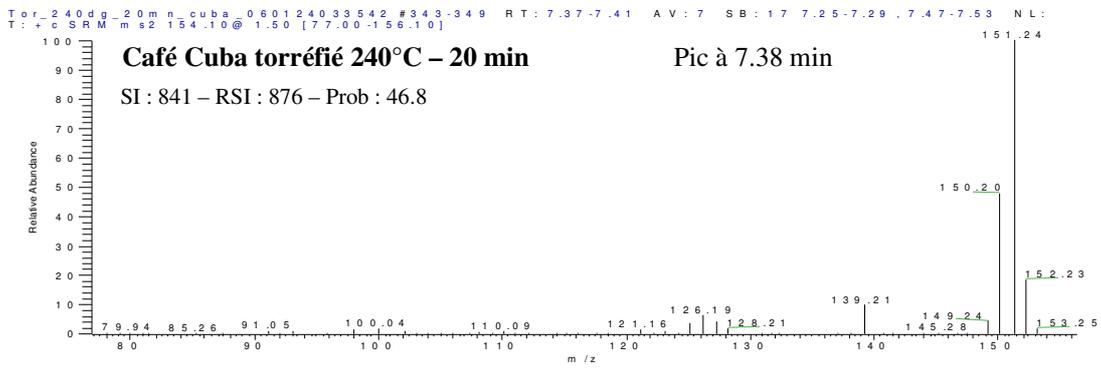
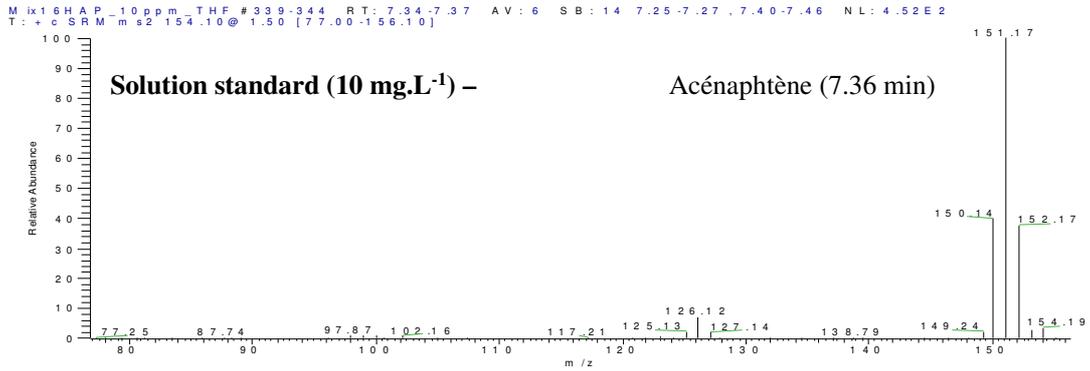
○ Identification du naphtalène



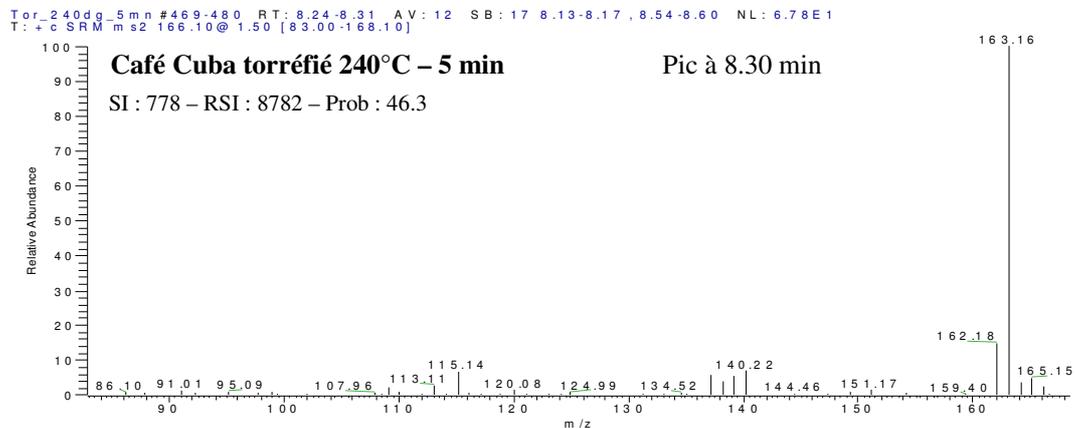
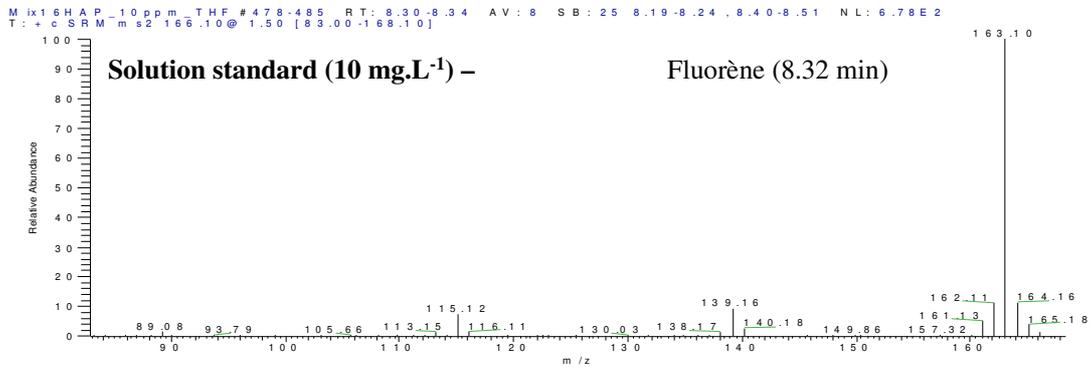
○ Identification de l'acénaphthylène



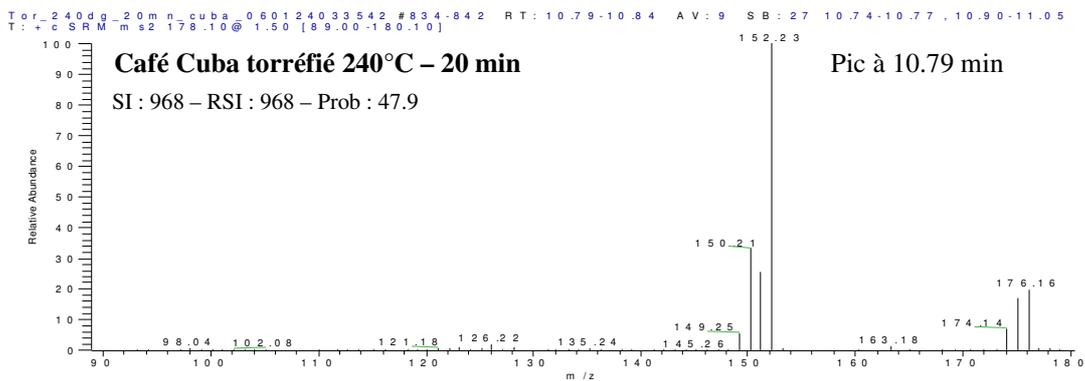
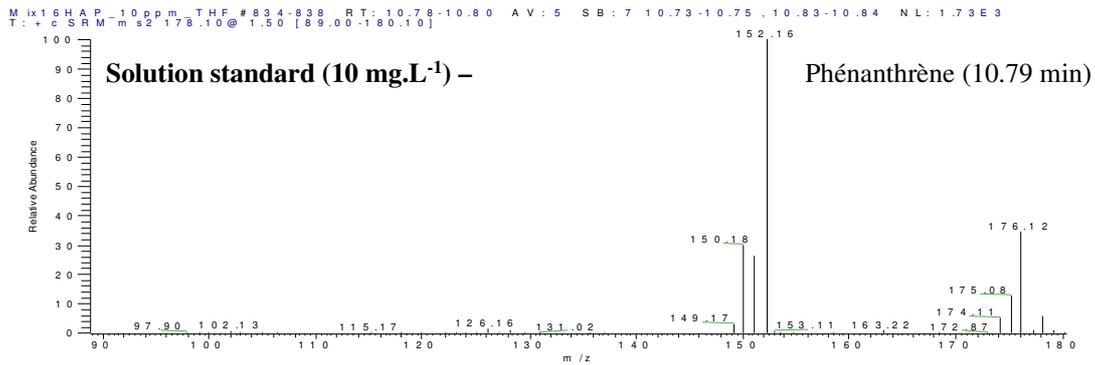
○ Identification de l'acénaphène



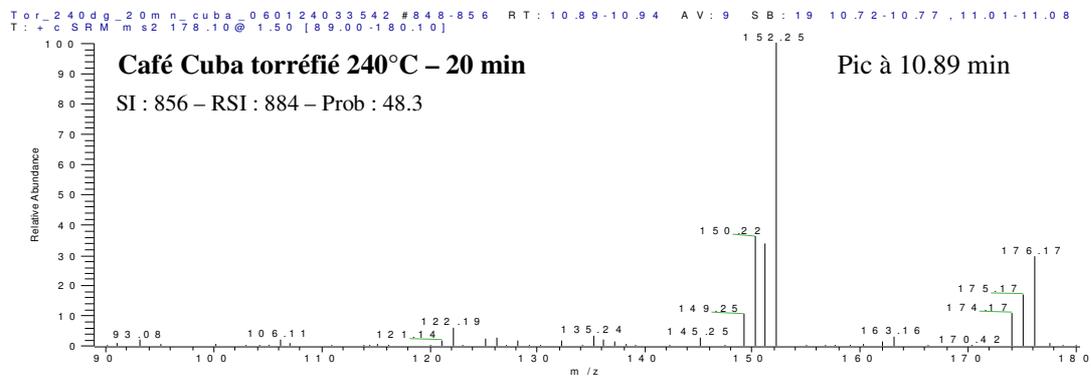
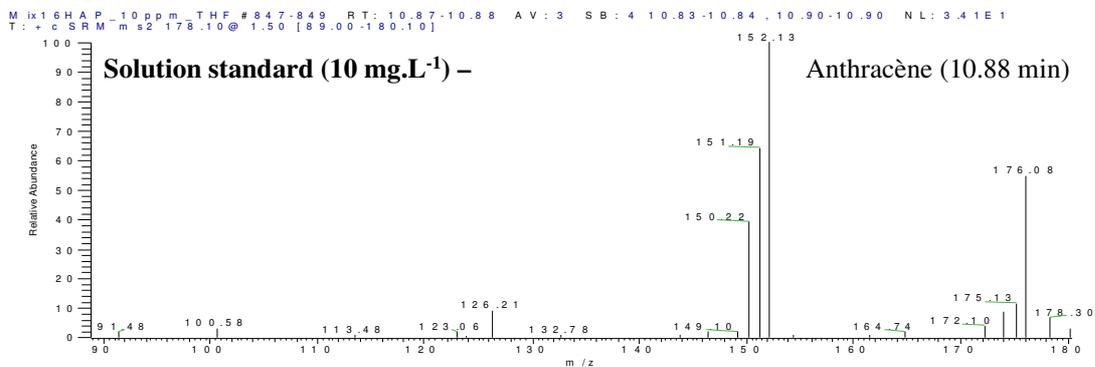
○ Identification du fluorène



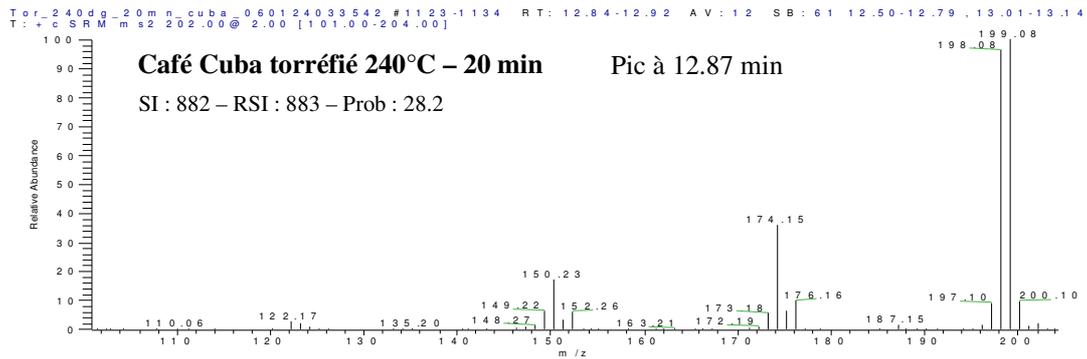
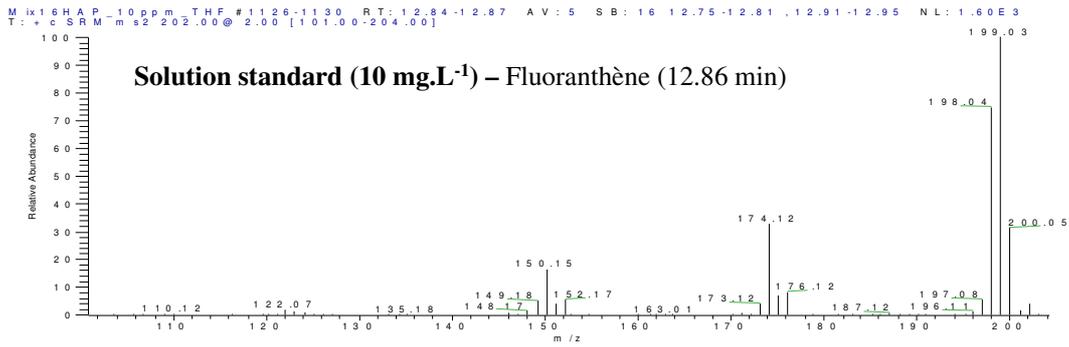
○ Identification du phénanthrène



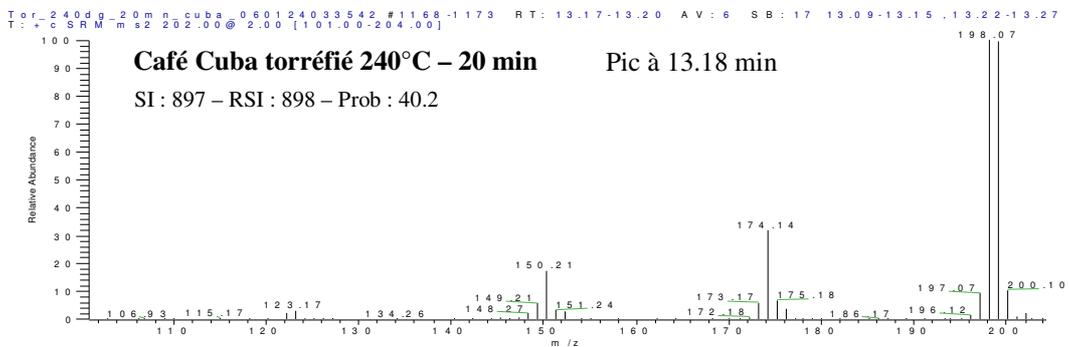
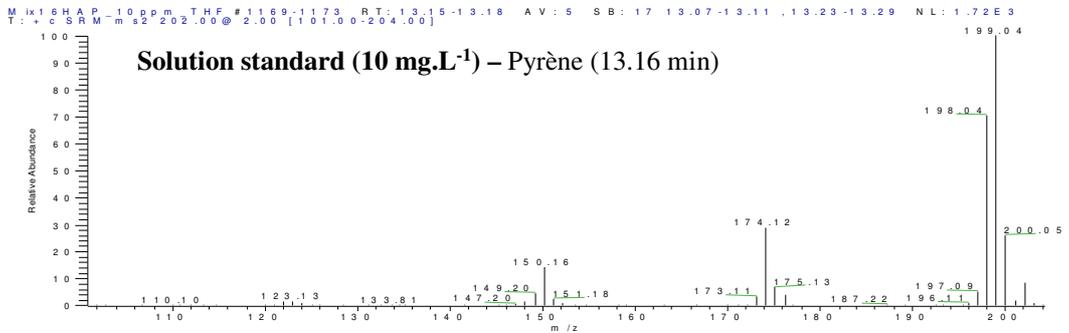
○ Identification de l'antracène



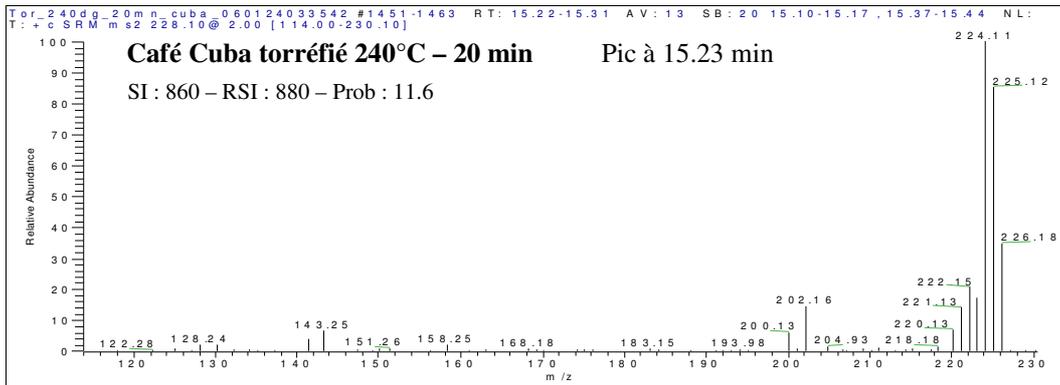
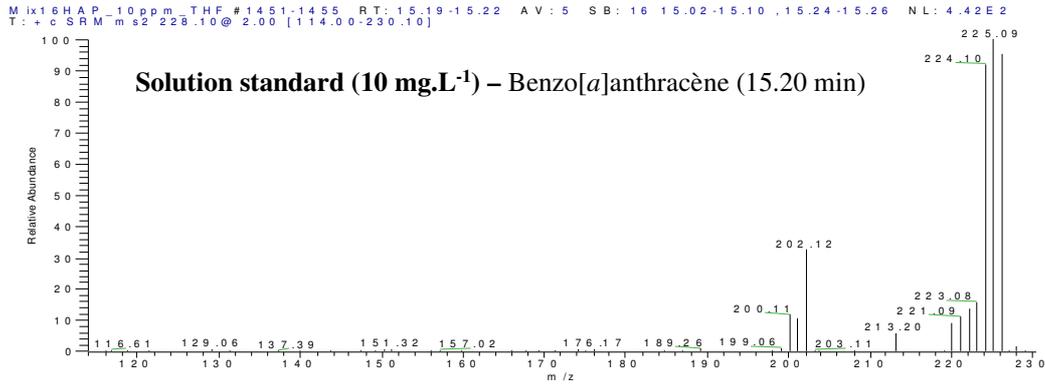
○ Identification du fluoranthène



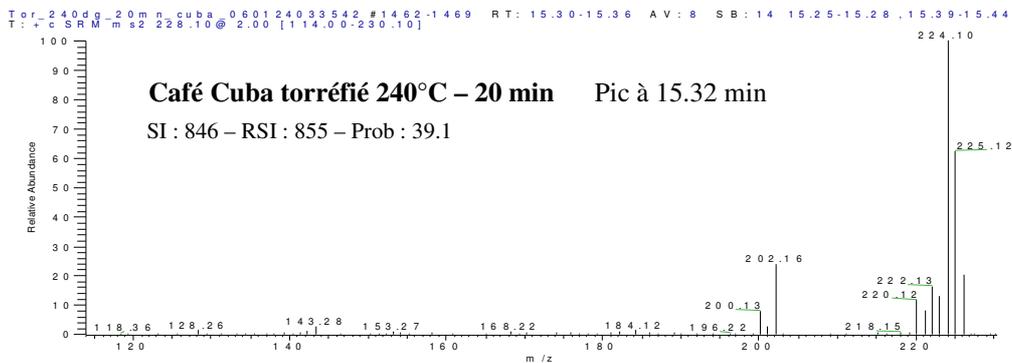
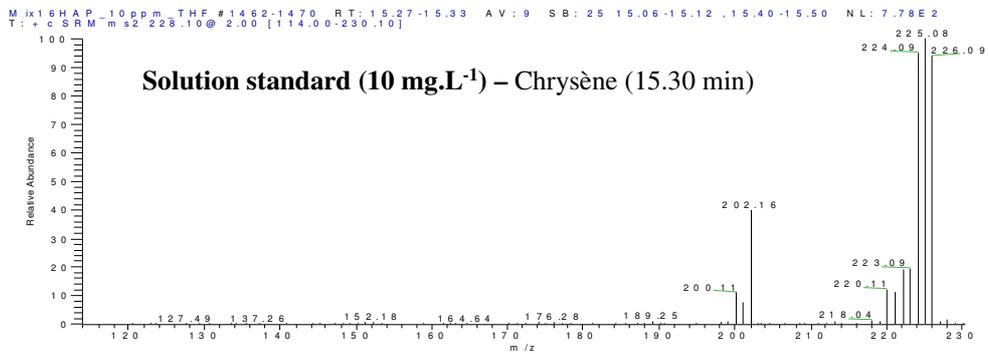
○ Identification du pyrène



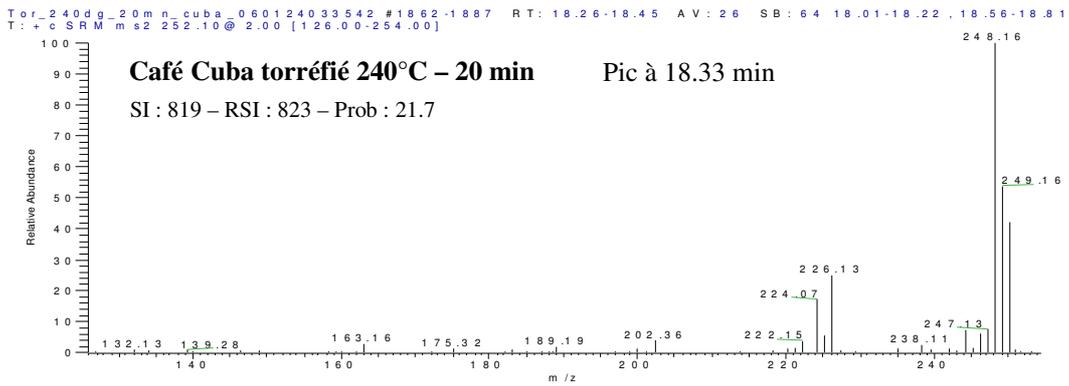
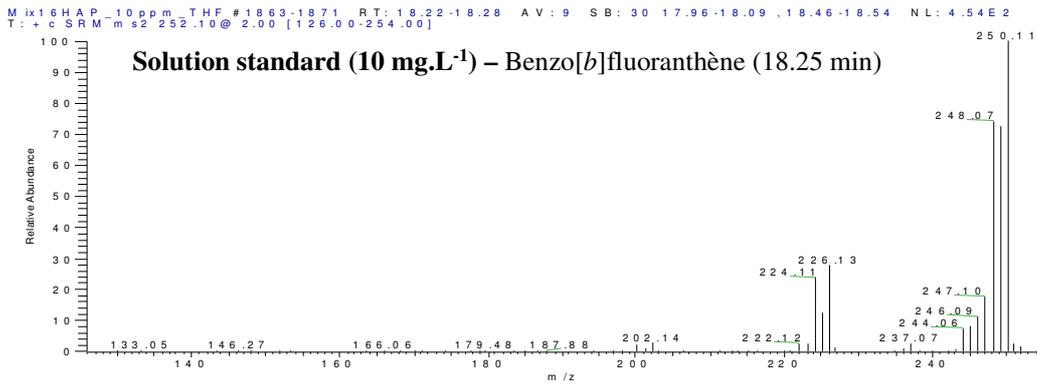
○ Identification du benzo[a]anthracène



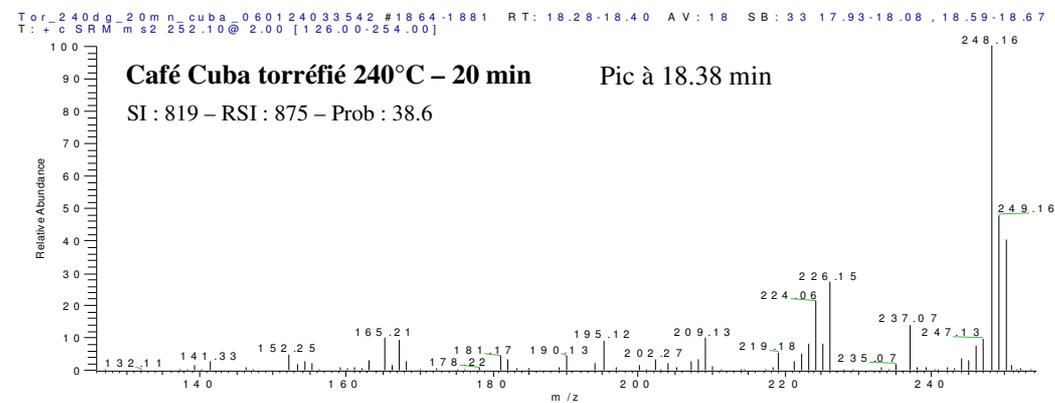
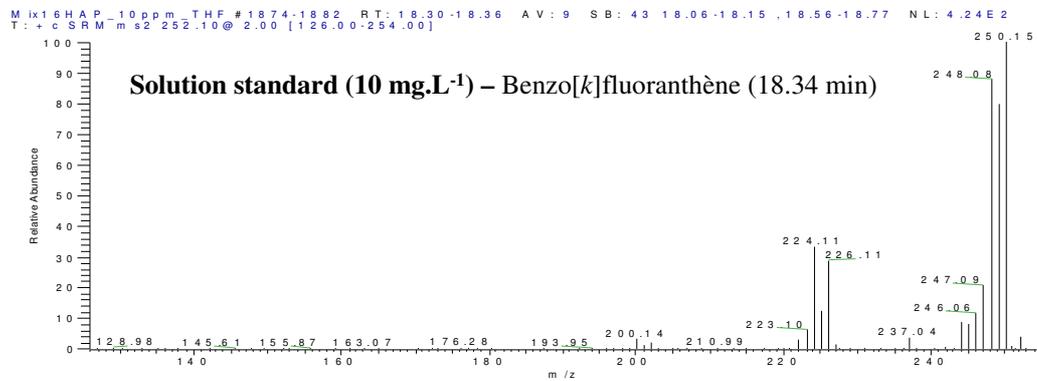
○ Identification du chrysène



○ Identification du benzo[*b*]fluoranthène



○ Identification du benzo[*k*]fluoranthène



○ Identification du benzo[a]pyrène

