

TP n° 2

Caractérisation des polyphénols et activité anti-oxydante de plantes médicinales

1. Introduction

Ce TP utilise des **réactions colorimétriques spécifiques** pour quantifier et caractériser les composés bioactifs dans les plantes :

1. **Réaction Folin-Ciocalteu** : Réduction des ions phosphomolybdiques/phosphotungstiques par les groupements phénoliques, produisant un complexe bleu mesurable à 765 nm.
2. **Test DPPH** : Capacité des antioxydants à donner un électron au radical libre DPPH•, provoquant une décoloration proportionnelle à l'activité antioxydante.
3. **Test FeCl₃** : Formation de complexes colorés entre les ions Fe³⁺ et les groupements phénoliques.

2. Objectif

- **Maîtriser** les techniques d'extraction solide-liquide des composés phénoliques.
- **Utiliser** correctement le spectrophotomètre pour des dosages quantitatifs.
- **Acquérir** les compétences nécessaires à l'analyse quantitative des composés bioactifs.
- **Etablir** des corrélations entre composition et activité biologique.

3. Matériel et méthodes

3.1. Equipements et produits

- Spectrophotomètre UV-visible.
- Bain-marie réglable à 40°C.
- Balance analytique (précision 0.01 g).
- Minuterie/chronomètre.
- Tubes à essai, fioles jaugées et béchers.
- Cuvettes spectrophotométrique.
- Pipettes graduées 1, 5, 10 ml et pipettes automatiques 100-1000 µl.
- Entonnoirs en verre.
- Papier filtre.
- Éthanol 70%.
- Réactif Folin-Ciocalteu.
- DPPH.
- Carbonate de sodium.
- Acide gallique.
- Acide ascorbique.
- Chlorure ferrique.
- Méthanol.
- Thym séché (*Thymus vulgaris*).
- Romarin séché (*Rosmarinus officinalis*).

3.2. Protocole expérimentale

ÉTAPE 1 : PRÉPARATION

1.1. Solutions mères

Solution Folin-Ciocalteu diluée 1:10

- Prélever 5 ml de Folin concentré avec pipette graduée.
- Verser dans fiole jaugée 50 ml.
- Compléter au trait avec eau distillée.
- Agiter doucement, conserver à 4°C.

CONTRÔLE : Solution jaune pâle.

Solution Na₂CO₃ 7,5%

- Peser 3,75 g de Na₂CO₃ sur balance analytique.
- Dissoudre dans 40 ml d'eau distillée chaude (50-60°C).
- Transvaser dans fiole jaugée 50 ml.
- Compléter au trait avec eau distillée.
- Laisser refroidir à température ambiante.

Contrôle: Solution limpide, pas de précipité.

Solution DPPH 0.1 mmol.l⁻¹

- Peser EXACTEMENT 1,97 mg de DPPH sur balance analytique.
- Dissoudre dans 50 ml de méthanol dans fiole jaugée.
- Agiter jusqu'à dissolution complète.
- Conserver dans flacon ambré à 4°C.

Contrôle: Solution violet intense ($A_{517} \approx 0.85-0.90$).

1.2. Courbes étalons

Courbe acide gallique (0-500 µg/ml)

- Solution mère : 50 mg acide gallique dans 50 ml éthanol 70%
- Préparer les dilutions suivantes :

Concentration (µg/ml)	Volume solution mère (ml)	Volume éthanol (ml)
0	0	10
100	2	8
200	4	6
300	6	4
400	8	2
500	10	0

- Étiqueter soigneusement chaque tube
- Conserver à 4°C pendant le TP.

ÉTAPE 2 : EXTRACTION

2.1. Préparation des échantillons

Pour chaque plante (thym et romarin) :

1. Broyage :

- Prendre 2-3 branches séchées de plante.
- Broyer finement au mortier et pilon.
- Homogénéiser la poudre obtenue.

2. Pesée précise :

- Tarer un bécher de pesée sur balance.
- Peser exactement 0,5 g de poudre.
- Noter la masse exacte.

3. Contrôles :

- Vérifier l'homogénéité de la poudre.
- S'assurer de l'absence d'humidité.

2.2. Extraction hydro-alcoolique

Pour chaque échantillon :

1. Transfert :

- Verser la poudre pesée dans un erlenmeyer 100 ml.
- Ajouter 25 ml d'éthanol 70% avec pipette graduée.

2. Extraction :

- Boucher l'erlenmeyer.
- Agiter vigoureusement 2 minutes.
- Laisser macérer 15 minutes à température ambiante.
- Agiter occasionnellement (toutes les 5 minutes).

3. Filtration :

- Placer un entonnoir sur un tube à essai propre.
- Garnir de papier filtre (pré-humidifié avec éthanol).
- Verser le mélange et laisser filtrer par gravité.
- Recueillir environ 10-15 ml de filtrat.

4. Dilution :

- Prélever 2 ml de filtrat avec pipette automatique.
- Ajouter 8 ml d'éthanol 70% dans tube à essai.
- Agiter pour homogénéiser (dilution 1:5).
- Étiqueter clairement : "Extrait dilué - [Nom plante]".

ÉTAPE 3 : DOSAGES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES

3.1. Dosage des polyphénols totaux

Protocole pour chaque échantillon:

1. Préparation des tubes :

- Tube essai propre et étiqueté.
- Ajouter 0,5 ml d'extrait dilué avec pipette automatique.
- PRÉCISION : Utiliser pipette 100-1000 µl réglée à 500 µl.

2. Réaction Folin :

- Ajouter 2,5 ml de Folin dilué 1:10.
- Agiter immédiatement au vortex 5 secondes.
- Laisser reposer exactement 5 minutes à température ambiante.
- MINUTERIE : Démarrer minuteur.

3. Développement couleur :

- Ajouter 2 ml de Na_2CO_3 7,5%.
- Agiter au vortex 10 secondes.
- Placer au bain-marie 40°C pendant 30 minutes.

CONTRÔLE : Respecter temps d'incubation.

4. Mesure spectrophotométrique :

- Préparer blanc : 0,5 ml éthanol 70% au lieu d'extrait.
- Régler spectrophotomètre à 765 nm.
- Faire le blanc avec la cuvette de blanc.
- Mesurer A_{765} de chaque échantillon.

3.2. Test activité antioxydante DPPH

Protocole pour chaque échantillon:

1. Préparation mélange réactionnel :

- Tube essai propre et étiqueté.
- Ajouter 1 ml d'extrait dilué avec pipette automatique.
- Ajouter 1 ml de solution DPPH 0,1 mmol.l⁻¹.
- Agiter immédiatement au vortex 10 secondes.

2. Incubation :

- Couvrir les tubes avec papier aluminium (obscurité).
- Incuber 20 minutes à température ambiante.
- MINUTERIE : Démarrer minuteur.

3. Mesure spectrophotométrique :

- Blanc : 1 ml méthanol + 1 ml DPPH.
- Témoin positif : 1,0 ml acide ascorbique 50 µg/ml + 1,0 ml DPPH.
- Régler spectrophotomètre à 517 nm.
- Faire le blanc avec cuvette de blanc.
- Mesurer A_{517} de chaque échantillon.

ÉTAPE 4 : TESTS QUALITATIFS

4.1. Test FeCl_3

Protocole :

1. Prélever 1 ml d'extrait dilué dans tube à essai.
2. Ajouter 2 gouttes de FeCl_3 1% ($\approx 100 \mu\text{l}$).
3. Agiter doucement et observer immédiatement.
4. Noter intensité sur échelle 0-3+.

Echelle couleur :

- 0 : Jaune (négatif).
- 1+ : Vert très pâle (faible).
- 2+ : Vert moyen (présence modérée).
- 3+ : Vert foncé/bleu (forte présence).

COMPTE-RENDU

1. Expliquez le principe de la réaction Folin-Ciocalteu. Pourquoi utilise-t-on l'acide gallique comme étalon ?
2. Pourquoi utilise-t-on l'éthanol 70% comme solvant d'extraction plutôt que l'éthanol pur ou l'eau pure ?
3. Présentez sous forme de tableau synthétique l'ensemble de vos résultats (absorbances, concentrations, pourcentages d'inhibition).
4. Quelle plante présente la plus forte teneur en polyphénols totaux ? Calculez le rendement d'extraction.
5. Comparez l'activité antioxydante des deux plantes. Observez-vous une corrélation avec leur teneur en polyphénols ?
6. Les tests qualitatifs (FeCl_3) confirment-ils vos résultats quantitatifs? Justifiez votre réponse.
7. Quelles sont les limites de la méthode Folin-Ciocalteu pour le dosage des polyphénols totaux?
8. Discutez des sources d'erreur potentielles dans ce protocole et proposez des améliorations.
9. Le test DPPH mesure-t-il toute l'activité antioxydante des extraits? Quelles autres méthodes pourriez-vous utiliser pour compléter cette évaluation?

10. Proposez un protocole pour étudier l'influence du solvant d'extraction sur la teneur en polyphénols.
11. Quels tests complémentaires pourriez-vous réaliser pour caractériser plus finement les composés bioactifs de ces plantes ?