

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique

École Nationale Polytechnique

Département de Génie Chimique



PROJET DE FIN D'ETUDES

Pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'État en Génie Chimique

Intitulé

**Extraction et Valorisation des  
Polyphénols**

**D'Inule Visqueuse**

Proposé et dirigé par :

**Mme R.DERRICHE**

Présenté par :

**AOUCHER Hocine**

PROMOTION JUIN 2010

# **DEDICACES**

Je dédie ce travail

A mes parents qui m'ont tout donné

A mes sœurs et frères

A mes cousins et cousines et toute la famille

A tous mes amis qui sont pour moi ma deuxième famille

Et à tous ceux qui ont contribué à ma formation

## REMERCIEMENTS

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à madame R.DERRICHE, Professeur à l'ENP, pour m'avoir confié ce sujet ; mais aussi pour les encouragements, conseils précieux, et les orientations qu'elle m'a accordée. Sans lesquels ce travail n'aurait pas pu aboutir.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à madame S.CHARCHARI Professeur à l'ENP de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.

Ainsi qu'à madame A.MEFTI Docteur à l'ENP, mademoiselle F.KIES Docteur à l'ENP,

Trouvez l'expression de nos vifs remerciements pour avoir accepté d'être membre de notre jury.

Et en fin je tiens vivement à remercier tous nos amis chacun à son nom.

## Résumé :

Notre travail concerne l'extraction par solvant et la valorisation des polyphénols d'Inule Visqueuse.

Premièrement, nous allons faire L'extraction des polyphénols par un mélange eau-acétone, pour cela nous avons adopté une méthode de dosage des polyphénols et nous avons étudié l'influence de la température, l'hydromodule et la granulométrie de la plante broyée sur le rendement en polyphénol.

Deuxièmement, la valorisation de l'extrait polyphénolique en évaluant son pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH.

Mots clés : inule visqueuse, polyphénols, extraction, antioxydant, rendement, valorisation.

## Abstract:

This work concerns the extraction by solvent and the valorization of polyphenols from *Inula Viscosa*.

First, We will extract the polyphenols by a mixing of water-acetone, so We shall adopt a method of polyphenols dosage and We shall study the influence of Temperature, hydromodule and granulometry on the polyphenols' extraction.

Second, We will evaluate the antioxidant power of our polyphénoliques extract by the DPPH method.

Key words: *Inula Viscosa*, polyphenols, extraction, antioxidant power, return, valorization.

## الملخص :

هذا العمل معنون استخلاص و تقييم مادة الدباغ من نبتة المقرمان.

اولا, سنقوم باستخلاص مادة الدباغ بمزيج من الماء و الاسيطون, لذا قمنا باختيار طريقة لمعايرة كمية الدباغ المستخلصة ثم قمنا بتغيير الشروط التجريبية (الحرارة, قطر الحبيبات و كمية المذيب بالنسبة للكتلة المستعملة).

ثانيا, سنقوم بتقييم المادة المستخلصة بقياس قوتها ضد الأوكسدة باستعمال طريقة الديبيبياش (DPPH)

الكلمات المفتاحية : الدباغ, المقرمان, استخلاص, تقييم.

# Sommaire

LISTE DES TABLEAUX.....	i
LISTE DES FIGURES.....	ii
ANNEXES.....	iii
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Description botanique de l’Inule Visqueuse.</b>	
I. Introduction :.....	2
II. Inule visqueuse :.....	2
II.1. Description botanique :.....	3
II.2. Structure générale de la plante.....	3
II.3. Utilisation de la plante.....	5
III. Quelques espèces d’inules.....	5
III.1. <i>Inula crithmoïde</i> .....	5
III.2. <i>Inula magnifica</i> .....	6
III.3. <i>Inula helenium</i> .....	6
III.4. <i>Inula salicina</i> .....	7
III.5. <i>Inula conyza</i> .DC.....	7
<b>Chapitre II : Les polyphénols.</b>	
I. Introduction :.....	9
II. Les principale sources de tanins.....	9
III. Structure et classification des tanins :.....	11
III.1 Tanins hydrolysables ou galliques :.....	11
III.1.1. Les ellagi-tanins ou tanins ellagiques.....	11
III.1.2. Les gallo-tanins ou les tanins galliques.....	11
III.2. Tanins condensés.....	11
IV. Propriétés des tanins :.....	12
IV.1. Propriétés physico-chimique.....	12
IV.2. Caractéristiques physiques des tanins.....	12
V. Caractérisation des tanins.....	13
V.1 Analyse colorimétrique.....	14
V.2Analyse colorimétrique.....	15
V.3 Analyse Gravimétrique.....	15
V.3.1 Méthode gravimétrique avec de l’ytterbium (Reed et col, 1985).....	15
V.3.2 Méthode gravimétrique basée sur le système détergent.....	15
V.3.3 Analyse par précipitation de protéine.....	16
V.3.4. Analyse combinée.....	16
V.3.5 Extraction des tanins et purification.....	17
VI. Ifférentes utilisations des tanins.....	18
VII. Les antioxydants.....	19
VII.1. Définitions.....	20
VII.2. Antioxydants naturels.....	20
VII.3. Mesure de l’état d’oxydation et du pouvoir antioxydant.....	21

### **Chapitre III : méthode de dosage des polyphénols.**

I.	Introduction.....	22
II.	Première méthode .....	22
III.	Deuxième méthode .....	24
IV.	Calcul d'erreur lors de la préparation des concentrations .....	27
	Conclusion.....	28

### **Chapitre IV : extraction des polyphénols de l'Inule Visqueuse.**

I.	Introduction.....	29
II.	Préparation de la plante.....	29
III.	Détermination du taux d'humidité.....	29
IV.	Extraction solide-liquide.....	31
	IV.1. Montage d'extraction solide-liquide.....	31
	IV.2. Protocole expérimental.....	32
	IV.3. Calcul du rendement en tanin.....	32
	IV.4. Essai préliminaire.....	32
	IV.5. Planification des essais.....	33
V.	Influence de la granulométrie.....	39
VI.	Etude de la cinétique d'extraction.....	40

### **Chapitre V : Extraction des polyphénols de la phase aqueuse et Evaluation de l'activité antioxydante.**

I.	Introduction.....	42
II.	Récupération de l'acétone.....	42
III.	Extraction des polyphénols de la solution aqueuse par l'acétate d'éthyle.....	43
IV.	Pouvoir antioxydant.....	45
	<b>Conclusion.....</b>	<b>48</b>

### **Bibliographie**

## **LISTE DES TABLEAUX :**

**Tableau II.1 :** Teneur en polyphénols de quelques produits alimentaires

**Tableau II.2 :** Activité anti-cancérogène des tanins

**Tableau II.3 :** les types d'antioxydants et leurs caractéristiques

**Tableau III.1 :** résultats du dosage 1<sup>ère</sup> méthode

**Tableau III.2 :** résultats d'analyse de l'absorbance pour la 2<sup>ème</sup> méthode

**Tableau III.3 :** Tableau résumant les résultats obtenus pour tracer la courbe d'étalonnage  $abs = f(C)$

**Tableau IV.1 :** diamètre et fraction massique des différentes classes d'échantillon à étudier.

**Tableau IV.2 :** résultats des essais pour le plan factoriel d'ordre 1

**Tableau IV.3 :** valeurs expérimentales et valeurs calculées des rendements à partir du modèle du premier ordre

**Tableau IV.4 :** résultats des essais complémentaire plan  $3^2$  multi niveau

**Tableau IV.5 :** Valeurs expérimentales et valeurs calculées des rendements à partir du modèle  $3^2$ .

**Tableau IV.6 :** couleurs des solutions à la fin des extractions

**Tableau IV.7 :** influence de diamètre des particules sur le rendement

**Tableau IV.8 :** évolution du rendement de l'extraction des polyphénols en fonction du temps

**Tableau V.1 :** pourcentage d'inhibition de radical DPPH par le GSE, vita E et C.

## **LISTE DES FIGURES :**

**Figure I.1 :** *Inula viscosa*

**Figure I.2 :** tige principale

**Figure I.3 :** poiles glandulaires

**Figure I.4 :** feuilles d'inule visqueuse

**Figure I.5 :** fleurs d'inule visqueuse

**Figure I.6 :** grain d'inule visqueuse

**Figure I.7 :** *Inula crithmoïde* (L)

**Figure I.8 :** *Inula magnifica*

**Figure I.9 :** *Inula helenium*

**Figure I.10 :** *Inula salicina*

**Figure I.11 :** *Inula conyza*

**Figure III.1 :** courbe représentant l'absorbance en fonction de la concentration d'acide tannique ( $\text{g.L}^{-1}$ )

**Figure III.2 :** Courbe absorbance en fonction de la concentration des solutions préparées.

**Figure III.3 :** Courbe d'étalonnage ;  $\text{abs} = f(C)$  en représentant les erreurs

**Figure IV.1 :** Montage de Dean et Stark

**Figure IV.2 :** montage d'extraction solide liquide

**Figure IV.3 :** évolution du rendement en fonction d'hydromodule.

**Figure IV.4 :** évolution du rendement en fonction de la température et de l'hydromodule

**Figure IV.5 :** Représentation des effets standardisés pour un seuil de confiance de 75

**Figure IV.6 :** différentes parties d'une feuille

**Figure IV.7 :** Calcul du coefficient de diffusion par le logiciel Exdif ( $T=45^{\circ}\text{C}$  ;  $H=40\text{mL}$ ).

**Figure V.1 :** montage de la distillation sous vide

**Figure V.2 :** montage de séparation liquide-liquide (décantation)

**Figure V.3 :** La réaction de la réduction de DPPH<sup>•</sup> avec les composés antioxydants

**Figure V.4 :** Pourcentage d'inhibition de DPPH par les antioxydants



# INTRODUCTION GENERALE

Après le printemps vient un deuxième printemps aussi magnifique, la floraison de l'inule visqueuse dans les montagnes vers mi-octobre, un paysage que toute personne qui passe, ne prend le temps d'admirer.

Pour nos ancêtres, sa beauté n'est rien devant son utilité, l'Inule visqueuse appelée MAGRAMAN en Algérie a de multiples usages et est très efficace. Elle est utilisée dans le domaine phytosanitaire, contre les douleurs au ventre, intoxication, les blessures, les brûlures... et dans le domaine agroalimentaire comme pour conserver les fruits et légumes, par exemple la grenade, conservée sous terre de l'automne jusqu'à l'été sans aucune dégradation, la pomme de terre est conservée en la couvrant avec l'inule visqueuse,...etc.

La plante est d'une grande valeur, mais cela doit être prouvé par études, nous avons donc essayé de valoriser l'inule visqueuse.

Le présent mémoire a pour objectif d'extraire les polyphénols à partir de l'inule visqueuse et de les valoriser par la suite comme antioxydants.

Ce travail comporte deux parties, une théorique qui se compose de deux chapitres l'un présente la plante du point de vue botanique, l'autre les polyphénols et leur pouvoir antioxydant. La deuxième partie pratique constituée de trois chapitres qui traite d'extraction solide-liquide, liquide-liquide, méthode de dosage et l'évaluation du pouvoir antioxydant.

# CHAPITRE I

## **Description botanique de l'Inule Visqueuse**

## I. Introduction :

Depuis le début des temps, l'être humain utilise des plantes pour lutter contre les douleurs et blessures. Ce sont les plantes qui constituent les médicaments du passé.

Certes l'utilisation des plantes médicinales, de la **phytothérapie** s'avère extrêmement **salvatrice** pour l'homme. Parfois une mauvaise utilisation des plantes médicinales peut entraîner d'autres problèmes de santé ou les accentuer.

Il est temps de **redécouvrir** ces végétaux trop longtemps oubliés, dont nous pouvons mettre à profit les multiples vertus dans notre vie quotidienne.

**L'inule** est un mot qui dérive du grec « inaien » qui signifie **purifié**, c'est une famille des plantes peu connue très utilisée dans l'**aromathérapie**, certaines inules ont des propriétés **diurétiques** [1].

Le genre *Inula* comprend environ **90** espèces. Les inules sont des plantes **vivaces** de la famille des **Astéracées**. Les inules se rapprochent des marguerites, avec deux types de fleurons : à la périphérie des fleurons ligulés, au centre des fleurons tubulés. Les fleurons périphériques du genre *Inula* sont femelles, tandis que les fleurons du centre sont hermaphrodites (mâle et femelle). Le fruit est surmonté d'une aigrette de soies disposées sur un seul rang, il est étranglé puis élargi au sommet. Les feuilles sont alternes. Chez les plantes du genre *Dittrichia* la multiplication naturelle se fait essentiellement par propagation des graines par le vent. Les inules peuvent aussi se diviser ou se bouturer en fin d'été. [2]

Les inules sont présentes à l'état sauvage, elles sont vivaces et reflowerissent tous les ans. Elles ne demandent aucun soin particulier mis à part un sol sec, elles se propagent là où la terre ne reste pas trop mouillée. Le calcaire est souvent présent dans les lieux où elles poussent.

## II. Inule visqueuse :



**Figure I.1** : *Inula viscosa*

## II.1. Description botanique :

L'inule visqueuse est une plante vivace à tige frutescente à la base de taille 40-100 cm, à rameaux rougeâtre, feuilles entières ou dentées, aigues sinuées, les caulinaires amplexicaules, plus largement lancéolés, plantes glanduleuse visqueuse à odeur forte. [3]

L'espèce pousse en général dans les régions méditerranéennes, elle se caractérise par les bractées sous les languettes jaunes externes qui sont visqueuses sur l'extérieur et qui justifie son nom.

Quant au nom du genre *Inula*, il dérive du grec qui signifie purifié car certaines inules ont des propriétés diurétiques. [4]

En Algérie, l'espèce est très connue sous le nom berbère **Magramène** dans les régions du tell, ou encore **Mersitt** chez les touareg. [3]

## II.2. Structure générale de la plante : [5]

L'inule visqueuse se caractérise par une forme de croissance droite verticale à partir de la terre, ses branches nombreuses se refoulent le long de la tige commune principale.



Figure I.2 : tige principale

Sa surface possède des cheveux appelés poils glandulaires qui soutiennent des glandes ou des gonflements à leur bout.



Figure I.3 : poils glandulaires

### **Les feuilles : [6]**

Les feuilles ont une forme de lance qui se forme le plus largement dans le troisième basique et s'enfilent graduellement vers le bout.



**Figure I.4 :** feuilles d'inule visqueuse

### **Les fleurs : [5]**

Les fleurs sont de couleur jaune lumineuse, de taille moyenne entre 20-22mm (pour les espèces méditerranéenne et de 15 mm dans certaines régions, elles possèdent une odeur légèrement douce et aromatique ; elles se composent de pétales rayonnant du réceptacle central, leur nombre dépend de la taille des fleurs mais en générale varie entre 12 et 18, et de 30 à 40 pour les sépales.



**Figure I.5 :** fleurs d'inule visqueuse

### **Les Grains : [5]**

Les fruits ont une structure apicale de couleur brun clair, leur nombre varie entre 40 -50 et leur taille ne dépasse pas 2 mm.



**Figure I.6 :** grain d'inule visqueuse

### **II.3. Utilisation de la plante [7] :**

- Les poils des feuilles, peuvent être appliqués directement sur une plaie. Ils permettent la cicatrisation en rapprochant les chairs tout en ayant une action coagulante.
- La lutte biologique contre la mouche d'olive.
- Pour obtenir des médicaments antimigraineux.

## **III. Quelques espèces d'inules :**

### **III.1. *Inula crithmoïde* (L.) [3] : (faux crithmum) :**

C'est une espèce des régions méditerranéennes plus exactement du bord de mer.

- **Tige :** taille entre 50 - 120 cm, branches nombreuses se refoulent le long de la tige.
- **Feuilles :** Allongées et charnues qui ressemblent à celles de la criste-marine
- **Fleurs :** Forment des capitules jaunes
- **Floraison :** Juillet - Octobre.
- **Milieu :** Dunes.



**Figure I.7 :** *Inula crithmoïde* (L)



### III.2. *Inula magnifica* (L.) [8] :

- **Tige** : taille entre 30 – 80 cm, dressée, simple.
- **Feuilles** : Molles, irrégulièrement inégales, obscurément dentées, assez étroitement lancéolées, longues et aiguës, parfois glabrescentes. Les inférieures atténuées en pétiole, à aigrette blanche ; capitules en corymbe.
- **Fleurs** : Jaunes à ligules glanduleuses mais non poilues.
- **Sol** : Sol meuble, bien drainé et frais.
- **Nom commun** : Aunée magnifique ; Grande aunée.



Figure I.8 : *Inula magnifica*

### III.3. *Inula helenium* (L.) :

Elle trouve son origine en Asie mais l'aunée a été bien vite adoptée par l'Europe.

- **Tige** : taille entre 80 – 150 cm, peut atteindre parfois **250 cm**, dressée.
- **Racines** : Le rhizome est de couleur gris brun avec de nombreuses rides.
- **Feuilles** : Forme du lancéolé, dentées avec une des faces un peu velue.
- **Fleurs** : Jaunes, **capitule** d'un diamètre variant de **6 à 8 cm**.
- **Racine** : amère et aromatique, est employée en médecine.
- **Noms communs** : Elle est aussi appelée camphre d'aunée, Lionne, OEil de cheval. Tfaulnée, A'enula Campana ou hélénine.
- **Habitat** : Prés humides, toute la France, sauf la région méditerranéenne.

L'huile essentielle d'aunée est extraite de sa racine [2].

Elle se compose essentiellement d'éléments dont les formules chimiques ont comme radical la lactone.

L'appellation *Inula helenium* sera un hommage à Hélène qui tenait une branche d'aunée au moment où elle fut enlevée



Figure I.9 : *Inula helenium* [3]



### III.4. *Inula salicina* [8]:

- **Tige** : Taille entre 20 – 60 cm, dressée, glabres et rarement un peu poilues, simples ou rameuses au sommet.
- **Feuilles** : Moyennes, larges à leur base et engainante à la tige faiblement denticulées et ciliées.
- **Fleurs** : Les capitules de jolies fleurs jaunes de **1 à 3 cm** de diamètre, rayonnantes, sans Poil.
- **Fleuraison** : De Juin à Août
- **Habitat** : Elle Pousse dans les lieux ensoleillés de plaines et de basses montagnes calcaires assez secs, dans les clairières.



Figure I.10 : *Inula salicina*

### III.5. *Inula conyza* .DC. [9]: ( Inule conyze)

*Inula conyza* est une plante commune dans les bois clairs ou sur leur lisière. La tige ramifiée porte des feuilles un peu gaufrées, pubescentes en dessous. Les petits capitules, plus hauts que larges, ont des ligules très courtes et parfois rougeâtres. Les bractées sont arquées.

**Hauteur** : 20 à 80 cm.

**Tige** : ramifiée.

**Feuilles** : un peu gaufrées.

**Fleurs** : petits capitules 8 à 12 mm, plus hauts que larges, ont des ligules très courtes et parfois rougeâtres. Les bractées sont arquées.

**Floraison** : juillet à septembre.

**Altitude** : 0 à 1200 m.



**Figure I.11 :** *Inula conyza*

# CHAPITRE II

Les poluphénols

## **I. Introduction :**

Le mot tanin a été utilisé pour la première fois en 1797 par SEGUIN pour désigner le constituant chimique de la noix de galle qui est capable de transformer la peau fraîche en cuir imputrescible et peu perméable.

En 1945, en France, alors que la richesse des cacahuètes en aminoacides laissait envisager la récupération de leurs protéines pour la nutrition humaine, le Professeur Masquelier menait des recherches à l'Université de Bordeaux sur la composition de la fine enveloppe rouge de la cacahuète. Ces études le menèrent à l'identification des premières procyanidines ou Oligomères ProCyanidoliques, OPC. En 1951, il fit breveter cette découverte [11].

Le Professeur Masquelier put, par la suite, réaliser de nombreux essais en laboratoire et réussit à isoler ces mêmes OPC à partir de l'écorce du pin. Plus tard, il constatera que les pépins de raisin sont également très riches en OPC.[13]

En 1987 MOLE et WATERMAN ont défini les tanins comme étant des "produits naturels phénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leurs solutions aqueuses [12].

Plus récemment et pour tenter d'accentuer la multiplicité des caractéristiques des groupements phénoliques des composés phénoliques, le terme polyphénol a été substitué par celui de «tanin »par HASLAM [13].

HAGERMAN quant à elle préfère utiliser le caractère qui distingue les tanins des autres composés phénoliques, elle les définit comme des composés « ayant la capacité de précipiter les protéines »[14].

Les tanins sont des substances extraites de nombreux produits alimentaires et végétaux, et considérés comme étant des polymères végétaux de la classe polyphénolique répondant à la formule brute  $(C_{76}H_{52}O_{45})_n$ , ils constituent alors des macromolécules de poids moléculaires compris entre 5000 et 20000. Ils se caractérisent par leurs capacités à former des complexes avec les protéines, les alcaloïdes et certains polysaccharides. Ces substances de structure variée et de saveur astringente ont la propriété de tanner les peaux en les rendant imputrescibles. Ils ont des propriétés antioxydantes [15].

## **II. Les principales sources de tanins :**

Les composés phénoliques sont présents dans la plupart des organes végétaux consommés par l'homme. Parmi les sources alimentaires de polyphénols on trouve le café (36,9%), le thé-vert ou le thé-noir (33,6%), le chocolat pour son cacao (10,4%), le vin rouge (7,2%), les fruits (6,7%)... etc [16].

On peut voir dans le tableau II.1 la teneur en polyphénols de quelques légumes et fruits.

**Tableau II.1 : teneur en polyphénols de quelques produits alimentaires [17].**

Légumes	Teneur en polyphénols (mg/100g)	Fruits	Teneur en polyphénols %
Artichaut cœur	321,3	Fraise	263,8
Persil	280,2	Litchi	222,3
Choux de Bruxelles	257,1	Raisin	195,5
Échalote	104,1	Abricot	179,8
Brocoli	98,9	Pomme	179,1
Céleri	84,7	Datte	99,3
Oignon	76,1	Cerise	94,3
Asperge	14,5	Figue	92,5
Aubergine	65,6	Poire	69,2
Ail	59,4	Nectarine blanche	72,7
Navet	54,7	Fruit de la passion	71,8
Salade	35,6	Mangue	68,1
Céleri rave	39,8	Pêche jaune	59,3
Radis	38,4	Banane	51,5
Pois	36,7	Ananas	47,2
Poireau	32,7	Citron	45
Poivre rouge	26,8	Nectarine jaune	44,2
Tomate cerise	26,4	Pamplemousse	43,5
Pomme de terre	23,1	Orange	31
Courgette	18,8	Clémentine	30,6
Poivre vert	18,2	Citron vert	30,6
Chicorée	14,7	Kiwi	28,1
Tomate	13,7	Pastèque	11,6
Fenouil	13	melon	7,8
Chou-fleur	12,5		
Carotte	10,1		

### **III. Structure et classification des tanins :**

#### **III.1 Tanins hydrolysables :**

Ce sont des tanins qui, en milieu acide ou en présence d'enzymes, se décomposent en substances plus simples et donnent des acides phénoliques (Voir les différents acide-phénols en Généralement l'acide gallique ou l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP)) et des polyesters de sucre généralement le glucose. [14]

En fonction des substances obtenues après hydrolyse, les tanins hydrolysables sont répartis dans deux catégories :

##### **III.1.1. Les ellagi-tanins ou tanins ellagiques**

L'hydrolyse de ces tanins conduit à la formation du « glucose » et de « l'acide HHDP », souvent accompagnée de ses dérivés biogénétiques telles que les acides « chébulique ». On les trouve dans les fruits et dans certains bois de plantes tels que terminaliachecula (myrobalans), les quercus valonea, les gousses de caesalpiniacoriaria.

##### **III.1.2. Les gallo-tanins ou les tanins galliques**

L'hydrolyse de ces tanins conduit à la formation de « l'acide gallique » et du « glucose » dans des proportions de 1/5 à 1/8, ils sont moins répandus que les ellagi-tanins mais ont néanmoins une importance commerciale plus importante. On les trouve surtout dans les espèces de la famille des amardiacaes.

#### **III.2. Tanins condensés**

Les tanins condensés sont aussi désignés par catechineouproanthocyaniodines, on les trouve surtout dans les écorces et les bois de mimosa et des arbres de la famille des légumineuses. Ils diffèrent fondamentalement des tanins galliques et ellagiques par :

- Leurs structures voisines de celle des flavonoïdes.
- Absence de sucre dans leur molécule. Non hydrolysables, ils ont, au contraire, tendance à se polymériser pour donner des produits de coloration rouge ou brune, nommés phlobaphènes, insolubles dans beaucoup de solvants.

Ils sont formés de 2 ou plusieurs molécules de flavanne-3-ols (catéchols ou catéchines) ou de flavanne-3,4-diols (leucoanthocyanes ou proanthocyanidols).[15]

## **IV. Propriétés des tanins :**

### **IV.1. Propriétés physico-chimique**

Les tanins sont des corps généralement amorphes, solubles dans l'eau, dans les alcools et dans l'acétone. Ils se dissolvent dans l'eau sous forme de solutions colloïdales, mais leur solubilité varie selon le degré de polymérisation (elle diminue lorsque celui-ci augmente). Ils sont insolubles dans les solvants organiques apolaires. On les extrait donc par des mélanges hydro-alcooliques additionnés ou non d'éther et par l'acétone [15].

Les tanins hydrolysables et les tanins condensés peuvent être distingués sur la base de leur comportement en milieu acide à chaud [10], ils possèdent des propriétés réductrices vis-à-vis des acides phosphotungstique, phosphomolybdique, du ferricyanure ferrique. Ils sont précipités par de nombreux réactifs.

#### **Précipitation : [18]**

- Les sels de métaux lourds : Fer, Plomb, Zinc, Cuivre.
- Les sels ferriques, on obtient des précipités colorés différemment selon la nature des tanins :
  - Bleu-noir avec les tanins hydrolysables.
  - Brun-vert avec les tanins condensés.
- L'eau de chaux, la baryte, le tungstate de sodium et aussi les protéines en général (poudre de peau, gélatine, albumines) et les alcaloïdes (ce qui en fait des contre-poisons efficaces) ;
- Le réactif de Stiasny ou formol chlorhydrique (tanins catéchiques uniquement).

#### **Réduction : [17]**

Les tanins possèdent des propriétés réductrices vis-à-vis des acides phosphotungstique, phosphomolybdique, du ferricyanure ferrique, etc.

### **IV.2. Caractéristiques physiques des tanins [11]**

- Couleur : qui va du blanc jaunâtre au brun qui fonce à la lumière.
- Odeur : légère et caractéristique.
- Goût : amer et ils sont astringents.
- Solubilité : les tanins se dissolvent dans l'eau, l'acétone et l'alcool, mais ni dans le benzène, ni dans l'éther ou dans le chloroforme.

Aspect : ils se présentent en morceaux plus au moins chamois, ou en palettes blanches paraissant cristallisées ou sous forme de pâte ou liquides sirupeux.

## V. Caractérisation des tanins

On utilise pour la caractérisation des tanins la capacité de ces derniers à se précipiter avec les sels ferriques.

- Les tanins galliques et ellagiques donnent des colorations et des précipités bleu-noir tandis que les tanins condensés donnent des précipités brun verdâtre.
- Les tanins galliques donnent une coloration rosée avec l'iodate de potassium (l'acide gallique libre est coloré en orange par ce réactif).
- Les tanins ellagiques sont colorés par l'acide nitreux en milieu acétique (d'abord rose, la coloration vire au pourpre puis au bleu).
- Les tanins condensés sont colorés en rouge par la vanilline chlorhydrique.

Les colorations par le chlorure ferrique et l'acide phosphotungstique sont surtout utilisés pour la détection des tanins à partir des solutions extractives (infusé à 10%) ou après chromatographie sur couche mince ou sur papier. La différenciation entre tanins galliques et tanins catéchiques est effectuée par addition de réactif de Stiasny. [11]

L'analyse des extraits fait appel aux techniques habituelles telles que :

- CCM sur cellulose ou silice où on analyse les révélations par examen des fluorescences par UV et par les réactifs FOLIN-DENIS, FOLIN-CIOCALTEU.
- HPLC en phase inverse avec solvants alcooliques légèrement acides.

La quantité et le type de tanins extraits changent considérablement selon l'espèce végétale, l'étape du développement et les conditions environnementales. En raison de la complexité des tanins, plusieurs méthodes fondées sur leur caractère phénolique ont été développées pour leur quantification. Aucune d'elles, cependant, n'est complètement satisfaisante du fait qu'elles ne différencient pas entre les tanins et les autres composés phénoliques.

Certaines méthodes permettent toutefois une certaine sélectivité, en particulier à l'égard des seuls tanins condensés. Pour nombre d'auteurs, les meilleures méthodes pour détecter et doser les tanins sont celles qui visent à évaluer leur capacité " spécifique " à précipiter les protéines. [18]

Les analyses chimiques des tanins peuvent être divisées en :

- Analyse colorimétrique.
- Analyse gravimétrique.
- Analyse par précipitation de protéine.
- Analyse mélangé.



## V.1 Analyse colorimétrique [18]

### ➤ **Méthode de Folin-Dennis et ces modifications (la méthode de Folin-Ciocalteu)**

La réaction est basée sur la réduction d'acide phosphomolybdique par des phénols en milieu alcalin aqueux, la méthode détermine les groupes phénoliques libres totaux et est donc une méthode pour déterminer les composés phénoliques solubles totaux qu'ils soient hydrolysables ou condensés.

Le problème de cette méthode est qu'elle ne différencie pas entre les tanins et beaucoup d'autres composés phénoliques qui ne sont pas des tanins. Des composés d'intervention tels que l'acide ascorbique, tyrosine et probablement glucose sont également mesurés.

### ➤ **Analyse par vanilline-HCl**

Utilisée pour analyser les tanins condensés, la vanilline réagit avec un anneau méta substitué des flavanols pour former un chromophore; le nombre de flavanols est proportionnel à l'absorbance de la solution.

L'inconvénient de cette méthode est qu'elle utilise la catéchine comme norme, ce monomère donne une densité optique maximum menant à la sous-estimation de grands polymères.

### ➤ **Analyse par butanol- HCl**

La méthode implique la dépolymérisation catalysée par HCl des tanins condensés dans le butanol pour rapporter un produit rouge d'anthocyanidine qui peut être détecté spectrophotométriquement.

L'inconvénient de cette méthode est que des polymères de tanins sont fondus dans des dimères ou des trimères, ce qui mène à une sous-estimation. Cette méthode ne permet d'analyser que les tanins condensés, combinée avec l'analyse par vanilline, elle peut nous renseigner sur le degré de polymérisation des tanins condensés. Ainsi le butanol mesure tout le nombre de résidus de flavonoïde présent dans l'échantillon tandis que l'analyse de vanilline mesure le nombre de molécules.

### ➤ **Analyse de rhodanine**

Cette méthode est utilisée pour analyser les gallo-tanins qui appartiennent à la catégorie des tanins hydrolysables. L'échantillon est soumis à l'hydrolyse pour libérer l'acide gallique. La réaction entre l'acide gallique et la rhodanine produit une couleur intense qui est mesurée spectrophotométriquement.

### ➤ **Analyse de Wilson et de Hagerman**

Cette méthode est utilisée pour analyser les ellagi-tanins qui appartiennent à la catégorie des tanins hydrolysables. Cette fois, l'échantillon est soumis à l'hydrolyse pour

libérer l'acide ellagique. La réaction entre l'acide ellagique et le nitrite de sodium produit une solution colorée qui est mesurée spectrophotométriquement.

### **Analyse chimique des tanins :**

La quantité et le type de tanins extraits changent considérablement selon l'espèce végétale, l'étape du développement et les conditions environnementales. En raison de la complexité des tanins, plusieurs méthodes fondées sur leur caractère phénolique ont été développées pour leur quantification. Aucune d'elles, cependant, n'est complètement satisfaisante du fait qu'elles ne différencient pas entre les tanins et les autres composés phénoliques.

Certaines méthodes permettent toutefois une certaine sélectivité, en particulier à l'égard des seuls tanins condensés. Pour nombre d'auteurs, les meilleures méthodes pour détecter et doser les tanins sont celles qui visent à évaluer leur capacité " spécifique" à précipiter les protéines. [18]

Les analyses chimiques des tanins peuvent être divisées en :

- Analyse colorimétrique.
- Analyse gravimétrique.
- Analyse par précipitation de protéine.
- Analyse mélangé.

## **V.3 Analyse Gravimétrique [18]**

### **V.3.1 Méthode gravimétrique avec de l'ytterbium (Reed et col, 1985)**

Cette méthode permet d'analyser seulement les tanins solubles, elle est basée sur la capacité de l'ytterbium trivalent de précipiter sélectivement des polyphénols. Son avantage est que le précipité peut être facilement dissous avec de l'acide oxalique pour rapporter une solution polyphénolique et Yb-oxalate insoluble. La solution peut être employée pour d'autres analyses (analyse chromatographie, études colorimétriques d'inhibition).

### **V3.2 Méthode gravimétrique basée sur le système détergent (Horvarthetcoll, 1981)**

Elle inclut les tanins solubles et insolubles. Cette méthode mesure le résidu détergent acide NAD du NDF (Neutraldetergentfiber) et le résidu détergent neutre du radiogoniomètre automatique. La différence NAD est employée pour estimer des tanins. Cette valeur a été employée avec succès dans l'équation sommative de Van Soest pour estimer la fraction des aliments non digestibles qui est due à l'action des tanins. L'inconvénient de cette méthode est que beaucoup de tanins solubles ne sont pas mesurés.

### **V.3.3 Analyse par précipitation de protéine [18]**

#### ➤ **Essai de la diffusion radiale (Hagerman, 1987)**

Cette méthode dépend de la formation des complexes entre les tanins et l'albumine de sérum de bœuf. Des extraits riches en tanins sont placés dans un agar, en rajoutant de l'albumine un précipité se forme sous la forme d'un cercle opaque. Le diamètre du cercle sera alors proportionnel à la quantité de tanins dans l'extrait. Des normes appropriées sont nécessaires pour estimer la quantité de tanins, elles sont généralement établies à partir de l'acide tannique et les résultats sont exprimés en équivalents acides tanniques. Cette méthode permet la détermination d'un grand nombre d'échantillons avec les équipements limités de laboratoire.

### **V.3.4. Analyse combinée [18]**

#### ➤ **Méthode de Giner-Chavez, 1996**

C'est une méthode pour les tanins condensés qui combine quelques méthodes précédentes afin d'essayer d'éliminer leurs problèmes principaux et réduire le temps exigé pour l'analyse.

La méthode se compose de :

- L'extraction des tanins en utilisant l'acétone aqueuse (méthode traditionnelle).
- Isolement des tanins condensés en utilisant l'ytterbium trivalent pour l'utiliser comme échantillon de référence.

#### ➤ **Analyse des tanins condensés en utilisant la méthode butanol-HCl**

L'innovation principale dans cette méthode est qu'au lieu d'employer un échantillon externe comme le québracho (comme suggéré pour l'analyse au butanol), des échantillons internes sont employés en utilisant des tanins de la même plante, car l'absorption change avec l'espèce végétale en raison de la grande variété de types de tanins actuels dans la nature.

### **V.3.5 Extraction des tanins et purification**

L'extraction des tanins peut être faite par des mélanges « eau-acétone » ou « eau-méthanol ». On préfère éviter en général le méthanol, il est connu comme un mauvais solvant pour certains composés phénoliques comme les glucosides car il provoque la méthanolyse des depsides et des galliques. On utilise un solvant acétonique plutôt que le méthanol ou l'éthanol pour extraire les polyphénols car il a l'avantage de précipiter les protéines et d'extraire faiblement les sucres. La proportion eau-acétone dépendra du végétal utilisé ainsi que des conditions opératoires.

Un rendement maximal est obtenu avec des tissus frais ou conservés par congélation ou lyophilisation car une partie des tanins est irréversiblement combinée à d'autres polymères. L'obtention de tanins purs nécessite le recours à des techniques chromatographiques appropriées, le plus souvent ce sont des chromatographies

d'exclusion sur gel suivies de chromatographies en phase inverse, toujours en milieu hydro-alcoolique ou hydro alcool- acétonique. [14]

D'autres méthodes de purification sont proposées par HAGERMAN[12], telles que l'adsorption par le Sephadex LH-20, ou leur précipitation sélective par l'ytterbium. [19]

## VI. Différentes utilisations des tanins

Les tanins possèdent surtout des propriétés astringentes en usages externes et internes. Les utilisations sont donc très variées.

Actuellement, la principale utilisation des tanins est le tannage des cuirs qui, grâce à leurs propriétés de se lier aux protéines, rendent les peaux imputrescibles et peu perméables. Plusieurs autres propriétés ont été trouvées telles que : l'astringence, propriétés antimicrobiennes, antivirales, hypoglycémiantes, bons contre-poisons des alcaloïdes et des métaux lourds ainsi qu'une capacité à inhiber les enzymes. [15]

- **En pharmacie** : on les utilise pour leur action astringente, comme anti-diarrhéiques, vasoconstricteurs (veines et petits vaisseaux) et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes.
- **En médecine** : les tanins peuvent avoir un effet :
  - Antimicrobien
  - Anti -mutagène
  - Anti-cancérigène, quelques exemples sont présentés dans le tableau II.2 ci-dessous :

**Tableau II.2** : activité anti-cancérigène des tanins [20]

tanin	cancer
acide chlorogénique	côlon, œsophage, poumon, peau (rongeur)
acide ellagique	
epigallocatechin-3-gallate(EGCG)	duodénum
polyphénols du thé vert	le poumon (souris) le côlon
Quercétin	peau, côlon et rongeurs
acide tannique	côlon, la peau (souris)
la consommation du thé	l'estomac, pulmonaire, et gastrique

- **Dans l'industrie**, ils sont largement employés, dans l'industrie des vernis et peintures. Ainsi divers produits fabriqués à partir du tanin ont été mis au point et brevetés notamment. [18]

- **Un apprêt anticorrosion** : Ce produit sert à traiter les surfaces d'acier rouillées avant l'application des peintures ; de telles surfaces devraient auparavant être nettoyées par des moyens mécaniques ou chimiques.
- **Convertisseur de rouille**: Il transforme l'acier oxydé en une surface lisse et scellée. Les essais ont révélé que le convertisseur de rouille au tanin de pin fonctionnait mieux que les convertisseurs commerciaux.
- **Colles à bois** : le tanin extrait est ajouté aux colles utilisées pour lier les copeaux de bois dans la production de panneaux de particules pour la construction, ils peuvent aussi remplacer le phénol et le résorcinol issu de l'industrie pétrochimique.
- **Antirouille**: le tanin est ajouté à l'huile minérale pour protéger l'acier laminé à froid contre la corrosion durant le transport et l'entreposage.
- **Encre** : en les faisant réagir avec les sels ferriques.
- Coagulation du caoutchouc.
- Clarification des vins et des bières.

De nombreuses données in vitro montrent que les composés phénoliques sont des antioxydants pouvant neutraliser les formes activées et toxiques de l'oxygène, ils jouent un rôle dans la santé humaine, soit en tant que composants de la ration alimentaire, soit entrant dans la composition du médicament. Par ailleurs, ils peuvent aussi être utilisés en agroalimentaire pour protéger les produits d'origine végétale ou animale, surtout ceux qui sont sensibles à l'oxydation comme les lipides. [21]

## VII. Les antioxydants

Le terme antioxydant (antioxygène) était à l'origine utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. À la fin du XIX<sup>e</sup> siècle et au début du XX<sup>e</sup> siècle, les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire par exemple la corrosion des métaux, la vulcanisation du caoutchouc et la polymérisation des carburants dans les moteurs à explosion.

En biologie, les premières recherches sur les antioxydants concernèrent la réduction de l'oxydation des acides gras insaturés, cause du rancissement. L'activité antioxydante était facilement mesurée en enfermant des corps gras dans des récipients hermétiques avec de l'oxygène, puis en vérifiant le taux d'absorption de ce dernier. Cependant, ce n'est qu'avec l'identification des vitamines A, C et E qu'est apparue l'importance des antioxydants dans la biochimie des organismes vivants.

## VII.1. Définitions :

Les antioxydants sont des réducteurs capables d'interrompre la réaction de peroxydation et d'empêcher la formation des hydroperoxydes et des peroxydes à partir des huiles insaturées en particulier.

Ce sont des composés naturels ou ajoutés, qui permettent de ralentir le phénomène d'oxydation qui fait rouiller les métaux, qui fait flétrir les légumes et les fruits, rancir les graisses. Il modifie le goût et la couleur des aliments.

En particulier, l'oxydation des lipides insaturés en présence d'oxygène sont des troubles majeurs qui peuvent intervenir soit dans la cellule elle-même soit lors de la préparation et de la conservation du produit utilisés par l'homme dans des domaines variés comme l'agroalimentaire, la pharmacologie et la cosmétologie. Elles conduisent à la formation de radicaux libres très réactifs et à des dérivés toxiques souvent carcinogènes et dont certains présentent des odeurs ou des saveurs désagréables. [21]

Un bon antioxydant doit présenter plusieurs propriétés :

- Efficacité à faible concentration.
- Compatibilité physique et chimique avec le substrat qu'il est censé protéger.
- Absence de toxicité.

## VII.2. Antioxydants naturels

Dans la nature et en particulier dans le monde végétal, outre les tocophérols de certaines graines et plantes, de nombreuses autres substances présentent des propriétés antioxydantes : polyphénols de l'olivier, du chêne, sésamol des graines de sésame, flavonoïdes des plantes (quercétine, myricétine, etc.), huiles essentielles extraites d'épices et d'herbes : thym, carvi, cumin, clou de girofle, romarin, sauge.

Le tableau II.3 suivant illustre les types d'antioxydants ainsi que leurs caractéristiques :

**Tableau II.3** : les types d'antioxydants et leurs caractéristiques : [21]

Antioxydants fournis par l'alimentation	Caractéristiques
<ul style="list-style-type: none"><li>• Acide ascorbique et ses sels<ul style="list-style-type: none"><li>-ascorbate de sodium</li><li>-ascorbate de calcium</li><li>-acide palmityl-6-ascorbique</li></ul></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-hydrosolubles</li><li>-protègent contre l'oxydation des constituants aromatiques</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Extraits naturels riches en tocophérols ou vitamine E</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-mélanges concentrés obtenus à partir d'huile végétales ou de leur sous produits.</li><li>Vitamine E – 4 tocophérols + 4tocotriénols</li><li>– Liposolubles (membranes)</li><li>– Graines céréales, noix et les huiles olive et tournesol</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Vitamine C</li></ul>	

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hydrosoluble</li> <li>- Recycle la vitamine E</li> <li>- Activité oxydante</li> <li>- Instable (lumière et T.)</li> <li>- Agrumes et légumes vert</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caroténoïdes</li> <li>• Glucosinolates</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rôle antioxydants</li> <li>- Présent dans plus de 600 plantes (fruits et légumes colorés)</li> <li>- Plantes crucifères, Choux, brocolis, etc</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Composés phénolique extrais des végétaux : <ul style="list-style-type: none"> <li>-thymol, carvacrol</li> <li>-acide carnosique</li> <li>-carnosol</li> <li>-acide rosmarinique</li> </ul> </li> <li>• Flavonoïdes</li> <li>• Catéchins</li> <li>• Anthocyanes</li> </ul>	<p>les végétaux riches en ces substances sont :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-la muscade, le clou de girofle, vanille une forte activité antioxydante est observée chez la sauge et le romarin</li> </ul> <p>Oignon, pommes thés - Isoflavones – soy – Raisins, vin rouge</p>
Antioxydant de synthèse	/
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tocophérols de synthèses <ul style="list-style-type: none"> <li>-α tocophérol</li> <li>-γ tocophérol</li> <li>-δ tocophérol</li> </ul> </li> </ul>	/
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gallates <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gallates de propyle</li> <li>- Gallates d'octyle</li> <li>- Gallatesdedodécyle</li> </ul> </li> </ul>	/
<ul style="list-style-type: none"> <li>• BHA (butyl hydroxy anisol)</li> </ul>	il accroît l'utilisation de la vitamine A il présente des propriétés tératogènes et cancérogènes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• BHT (butyl hydroxy toluène)</li> </ul>	il agit au niveau du métabolisme énergétique du foie, poumons et de la coagulation sanguine
<ul style="list-style-type: none"> <li>• TBHQ(ter-butyl-hydroxyquinone)</li> <li>• Ethoxyquinone</li> </ul>	possibilité de provoquer des effets toxiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erythorbates de sodium</li> </ul>	/

### VII.3. Mesure de l'état d'oxydation et du pouvoir antioxydant

En pratique, la mesure du pouvoir antioxydant est bien souvent empirique, et l'on se base sur les indices chimiques permettant d'apprécier l'état d'oxydation d'un corps gras. On peut citer :

- l'indice de peroxyde.
- d'autres indices, indice d'acidité, indice de p-anisidine, permettant d'apprécier les aldéhydes  $\alpha$ -éthyléniques, le test à l'acide thiobarbiturique qui mesure le dialdéhyde inalonique, l'indice de carbonyle, l'indice d'oxygène oxirane, etc.

Parmi les méthodes qui permettent une mesure globale du pouvoir antioxydant de substances pures ou en mélanges basés sur les propriétés antiradicalaires des composés phénoliques on peut citer:

#### ➤ **Méthode DPPH**

Le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical stable  $R^\circ$  à température ordinaire de couleur bleue intense. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer des radicaux libres) se fait en mesurant la décoloration (violet -jaune) due à la réduction de  $DPPH^\circ$  par les composés phénoliques. La décoloration est suivie en spectroscopie visible à 515nm. La méthode est standardisée par rapport à la quercétine.

#### ➤ **Méthode ORAC**

Cette méthode mesure la capacité d'un antioxydant à empêcher l'oxydation d'une sonde fluorescente par des radicaux libres de type  $ROO^\circ$ . La sonde utilisée est la fluorescéine ; le radical est l'AAPH (2,2-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride) qui se décompose à 37°C en deux radicaux libres. Le test est réalisé en spectrofluorimétrie.



# CHAPITRE III

Méthode de dosage des polyphénols

## **I. Introduction :**

Avant de commencer l'extraction solide-liquide, nous devons maitre au point une méthode de dosage des polyphénols. Nous avons choisi d'utiliser la méthode colorimétrique de FOLIN CIOCALTEU citée dans tous les travaux et publications sur les tanins.

## **II. Première méthode :**

La méthode que nous allons tester est décrite par V.L. SINGLETON et S.A. ROSSI (1965) [23], depuis des modifications ont été faites dans plusieurs travaux qui permettent d'économiser le réactif et d'améliorer les résultats.

Nous allons réaliser des essais pour vérifier une version donnée dans une publication qui semble économique vis-à-vis du réactif, dans ce travail on préconise un domaine de concentrations où la densité optique (do) est inférieure à 0,5. [24]

### **Réactifs employés :**

1. Réactif de FOLIN-CIOCALTEU : tungstate de Na,  $H_3PO_4$ , HCl, sulfate de Li, Br, préparation complexe, utiliser de préférence le réactif prêt à l'emploi, qui doit être à peine verdâtre. En présence de phénols, le mélange d'acides phosphotungstique et phosmolybdique est réduit en oxydes bleus de tungstène et de molybdène que l'on détermine par colorimétrie.

2.  $Na_2CO_3$  75 g.L<sup>-1</sup>.

### **Mode opératoire :**

- Préparation des échantillons de concentrations différentes d'acide tannique.
- Dilution du réactif FOLIN CIOCALTEU dix fois.
- Préparation d'une solution de  $Na_2CO_3$  (75 g.L<sup>-1</sup>).

Dans un tube à essai on met :

1. 0.5 mL de l'échantillon
2. 2.5mL du réactif dilué 10 fois. Agiter et laisser pendant 5 min.
3. 2 mL de la solution  $Na_2CO_3$  (75 g.L<sup>-1</sup>). Agiter et laisser pendant 5min.

Puis on met le tube dans un bain-marie (50°C) pendant 5 min, on refroidit dans la glace et on lit l'absorbance à 760 nm.

### **Les solutions préparées sont les suivantes :**

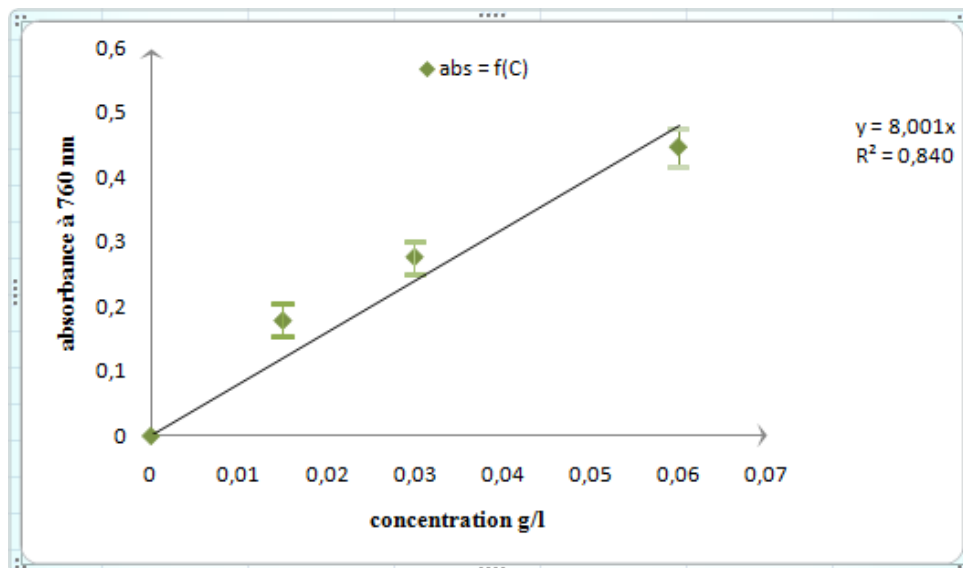
Échantillon mère de concentration 15 g.L<sup>-1</sup>, on effectue les dilutions suivantes :

0.15 g.L<sup>-1</sup> 0.015 g.L<sup>-1</sup> 0.03 g.L<sup>-1</sup> 0.06 g.L<sup>-1</sup>

Les résultats de dosage sont donnés dans le tableau III.1 :

**Tableau III.1 : résultats du dosage**

Concentration g.L <sup>-1</sup>	N° tube	Absorbance 760µm			Moyenne des trois lectures	Moyenne globale
		Lecture 1	Lecture 2	Lecture 3		
0,015± 0,001	1	0,180	0,181	0,181	0,181±0,001	0,179±0,025
	2	0,171	0,171	0,172	0,171±0,001	
	3	0,154	0,166	0,167	0,162±0,008	
	4	0,176	0,195	0,182	0,184±0,011	
	5	0,199	0,203	0,202	0,201±0,002	
	6	0,173	0,172	0,170	0,172±0,002	
0,150±0,006	7	1,392	1,391	1,390	1,391±0,001	1,256±0,136
	8	1,121	1,120	1,120	1,120±0,001	
0,030±0,001	9	0,246	0,248	0,248	0,247±0,001	0,277±0,031
	10	0,294	0,293	0,294	0,294±0,001	
	11	0,287	0,287	0,286	0,287±0,001	
	12	0,280	0,281	0,283	0,281±0,001	
0,060±0,002	13	0,416	0,416	0,416	0,416±0,000	0,447±0,031
	14	0,464	0,462	0,463	0,463±0,001	
	15	0,451	0,451	0,452	0,451±0,001	
	16	0,457	0,458	0,458	0,458±0,001	



**Figure III.1 :** courbe représentant l'absorbance en fonction de la concentration d'acide tannique (g.L<sup>-1</sup>)

La courbe d'étalonnage ne suit pas la loi de Beer Lambert, nous sommes dans un domaine de concentrations élevées, nous allons procéder à l'établissement de la courbe dans un intervalle de concentrations plus faibles.

### **III. Deuxième méthode :**

La deuxième méthode est une méthode colorimétrique de FOLIN-CIOCALTEU, qui est décrite par SRISUWAN [25], comme suit :

#### **Réactifs employés :**

1. Réactif de FOLIN-CIOCALTEU.
2.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4.25%.

On utilise les concentrations préparées pour la première méthode,

#### **Mode opératoire :**

1. On verse dans un erlenmeyer :  
0.2 mL d'échantillon dilué autant de fois qu'il est nécessaire.  
1 mL de réactif de FOLIN-CIOCALTEU.  
20 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4.25%
2. Agiter, verser dans un tube à essais.
3. Porter au bain-marie à 70°C pendant 20 mn.
4. Refroidir sous un courant d'eau froide.
5. Analyser au spectromètre à 760 nm par rapport à une solution témoin (eau distillée)

Les résultats sont donnés dans le tableau III.2

**Tableau III.2 : résultats d'analyse de l'absorbance pour la deuxième méthode**

C (g.L <sup>-1</sup> )	N° tube	Lecture 1	Lecture 2	Lecture 3	Moyenne dans le tube	Erreur de l'appareil	Moyenne globale
0,015	1	0,041	0,041	0,041	0,041	±0,001	0,041±0,004
	2	0,045	0,039	0,040	0,041	±0,004	
0,03	3	0,076	0,077	0,079	0,077	±0,002	0,076±0,008
	4	0,072	0,072	0,072	0,072	±0,000	
	5	0,084	0,082	0,084	0,083	±0,001	
0,02	6	0,069	0,068	0,069	0,069	±0,001	0,080±0,025
	7	0,099	0,098	0,099	0,099	±0,001	
	8	0,099	0,099	0,099	0,099	±0,000	
	9	0,055	0,055	0,056	0,055	±0,001	

Ces résultats nous confirment que l'appareil de mesure est de bonne précision, les résultats dans le même tube sont très proches exception pour le tube 2, par contre l'erreur de manipulation est très grande et ça se voit pour la concentration 0.02 g.L<sup>-1</sup> où l'écart de lecture d'absorbance est de ±0,025.

Cela est dû à un précipité blanc qui se forme au cours de la réaction. Donc la mesure de la densité optique est faussée par les particules encore piégées dans la solution, ce qui augmente la valeur lue.

- Pour déterminer la cause de l'apparition de ce précipité, nous avons réalisé deux essais :

Le premier contient uniquement le réactif de FOLIN CIOCALTEU et la solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.25%). Le résultat, une grande précipitation qui commence par une apparition d'une couleur blanche à partir de la 12<sup>ème</sup> minute et qui finit par la formation du précipité.

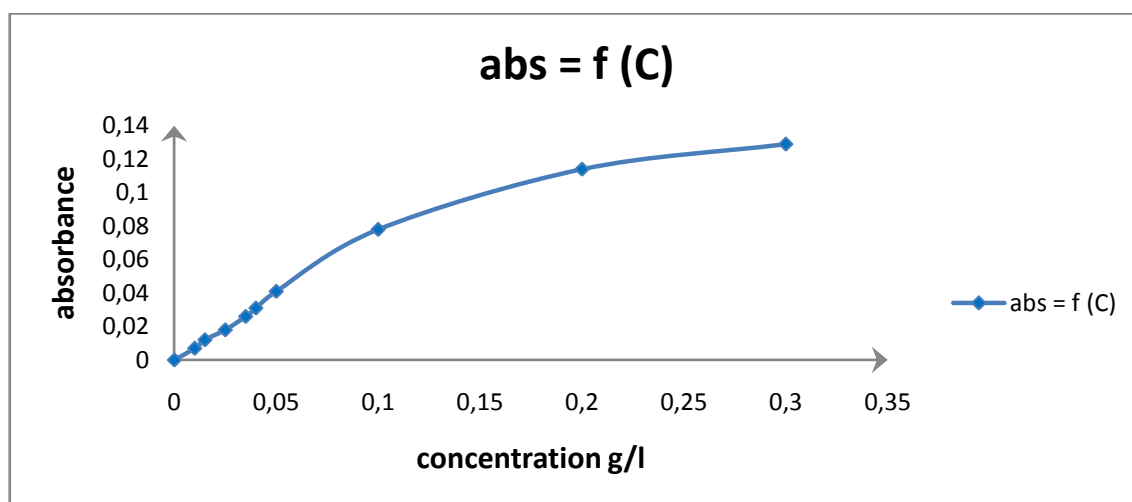
Le deuxième contient uniquement Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.25%). Le résultat, une précipitation moins importante qui commence avec une apparition de la couleur blanche à partir de la 14<sup>ème</sup> minute et qui précipite après.

La cause de la précipitation est probablement la température élevée de bain-marie (70°C) et la durée d'immersion des tubes dans l'eau chaude.

Nous avons essayé d'établir la courbe d'étalonnage avec un temps d'immersion de 5mn. Les résultats sont très satisfaisants et représentés dans le tableau III.3

**Tableau III.3 :** Tableau résumant les résultats obtenus pour tracer la courbe d'étalonnage  $\text{abs} = f(C)$

C [g.L <sup>-1</sup> ]	N° tube	Lecture d'absorbance			Moyenne de lecture	
		lecture 1	lecture 2	lecture 3	Moyenne de chaque tube	Moyenne globale
0,01	1	0,008	0,007	0,007	0,007±0,001	0,007±0,001
	2	0,007	0,008	0,007	0,007±0,001	
0,015	3	0,012	0,012	0,013	0,012±0,001	0,012±0,001
	4	0,012	0,012	0,012	0,012±0,000	
0,025	5	0,017	0,018	0,017	0,017±0,001	0,017±0,001
	6	0,017	0,017	0,018	0,017±0,001	
0,035	7	0,026	0,027	0,026	0,026±0,001	0,026±0,001
	8	0,027	0,026	0,026	0,026±0,001	
0,04	9	0,031	0,030	0,031	0,031±0,001	0,038±0,001
	10	0,031	0,031	0,031	0,031±0,000	
0,05	11	0,041	0,041	0,041	0,041±0,000	0,048±0,001
	12	0,041	0,041	0,041	0,041±0,001	
0,1	13	0,079	0,079	0,078	0,079±0,001	0,078±0,001
	14	0,078	0,078	0,079	0,078±0,001	
0,2	15	0,114	0,114	0,114	0,114±0,000	0,114±0,001
0,3	16	0,129	0,129	0,130	0,129±0,001	0,129±0,001



**Figure III.2 :** Courbe absorbance en fonction de la concentration des solutions préparées.

Nous remarquons que la courbe n'est utilisable que pour la partie où la concentration est inférieure ou égale à 0.04 g.L<sup>-1</sup> et donc c'est la partie utile de la courbe que nous portons sur la figure IV.4.

#### IV. Calcul d'erreur lors de la préparation des concentrations :

##### • Préparation des solutions :

La solution mère d'acide tannique (10g/l) :

- (1,0000±0.0001) g d'acide tannique
- Dilution (100±1) mL

$$C_0 = m/v \rightarrow \Delta C_0 = 100 * (\Delta m/m + \Delta v/v) * C_0 \rightarrow \Delta C_0/C_0 = 1.1 \%$$

⇒ la concentration est de 10,0±0,1 g.L<sup>-1</sup>

##### Pour les dilutions :

**(0,2 g.L<sup>-1</sup>) :**

- Pipette (1,00±0.01) mL → v<sub>1</sub>
- Fiole (50±1) mL. → v<sub>2</sub>
- Solution mère (10,0±0,1) mL

$$C_1 = (C_0 * v_1) / v_2 \rightarrow \Delta C_1/C_1 = \Delta C_0/C_0 + \Delta v_1/v_1 + \Delta v_2/v_2 \rightarrow \Delta C_1 = 4,1\%$$

⇒ la concentration est (0.200 ± 0.008) g.L<sup>-1</sup>

**(0.1 g/l) :**

- Pipette (1,00±0,01) mL → v<sub>1</sub>
- Fiole de (100±1) mL → v<sub>3</sub>
- Solution mère (10,0±0,1) g.L<sup>-1</sup>

$$C_2 = (C_0 * v_1) / v_3 \rightarrow \Delta C_2 = 3,1\%$$

⇒ la concentration est (0.100±0.003) g.L<sup>-1</sup>.

**(0.05 g.L<sup>-1</sup>) :** même chose avec 100 fois mais dans une fiole de (200±2) mL

⇒ 3.1% → la concentration est (0.050±0.001) g.L<sup>-1</sup>.

**(0.04 g.L<sup>-1</sup>) :**

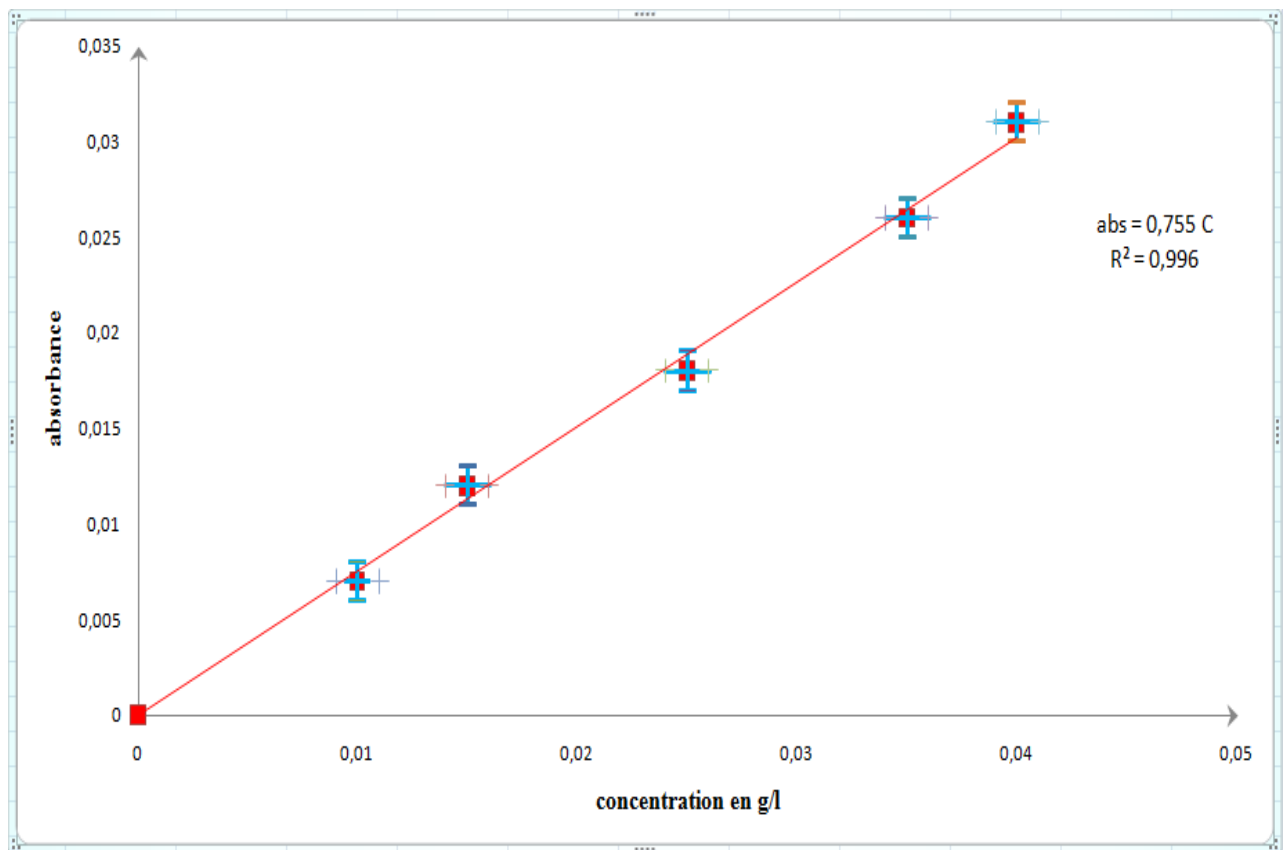
- Solution mère (10,0±0,1) g.L<sup>-1</sup>.
- Pipette (1,00±0.01) mL.
- Fiole (25,0±0,2) mL.
- Pipette (10.00±0.01) mL.
- Fiole (100±1) mL.

⇒ 3% → la concentration est (0.04 ± 0.001) g.L<sup>-1</sup>.

**(0.02 g.L<sup>-1</sup>) :**

- Pipette (1,00±0.01) mL utilisé deux fois.
- Fiole (50±0.5) mL.
- Fiole (100±1) mL.

⇒ 5,1% → la concentration est 0.020 ± 0.001 g.L<sup>-1</sup>.



**Figure III.3 :** Courbe d'étalonnage ;  $abs = f(C)$  en représentant les erreurs

## V. Conclusion :

Nous optons pour la deuxième méthode avec une modification du temps de séjour dans le bain pour éviter la précipitation. La loi de Beer Lambert est respectée, et les mesures sont reproductibles.



# CHAPITRE IV

L'extraction des polyphénols de l'Inule  
visqueuse

## I. Introduction :

Dans cette partie nous allons exposer les différentes procédures d'extraction des polyphénols à partir de l'inule visqueuse.

Tous les résultats obtenus lors de ce travail sont exprimés par rapport à la matière sèche (MS), cette dernière est déterminée en mesurant l'humidité de l'inule visqueuse dans l'appareil DEAN et STARCK.

## II. préparation de la plante :

Les feuilles d'inule visqueuse sont cueillies en mois de décembre de l'an 2009 dans la région d'Alger, elles sont ensuite séchées à l'ombre et broyées en petites particules de diamètre inférieur à 0.25mm, l'échantillon obtenu est formé de quatre classes de diamètres données dans le tableau IV.1 :

**Tableau IV.1 :** diamètre et fraction massique des différentes classes d'échantillon à étudier.

	Intervalle de diamètre en $\mu\text{m}$	Fraction dans l'échantillon % massique
Classe 1	250 - 224	19.44
Classe 2	224 - 160	17.69
Classe 3	160 – 112	45.32
Classe 4	<112	17.55

## III. Détermination du taux d'humidité [26] :

L'appareil de Dean Stark est un montage de verrerie de laboratoire utilisé en chimie des synthèses pour extraire l'eau (ou parfois d'autres liquides).

Il est utilisé en association avec un réfrigérant à eau et un chauffe-ballon afin d'éliminer l'eau par chauffage à reflux.

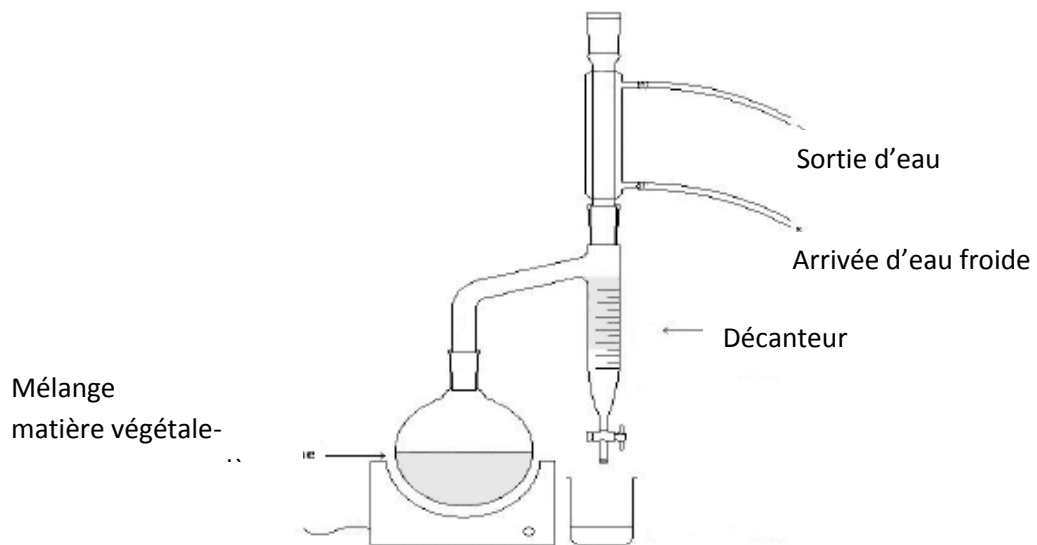
Au cours du chauffage, des vapeurs contenant le solvant et l'espèce à extraire montent jusqu'au condenseur et, une fois liquéfiées, tombent dans le cylindre gradué. A l'intérieur de celui-ci les liquides non-miscibles se séparent en deux phases. Lorsque la phase supérieure (moins dense) (le xylène) atteint le niveau du bras, elle coule dans celui-ci et retourne dans le ballon réacteur, alors que la phase inférieure reste dans le cylindre (l'eau).

On attend que les phases se séparent bien ensuite on lit sur les graduations le volume d'eau contenue dans la matière végétale.

On lit la température à laquelle la lecture était faite et on prend la densité de l'eau à cette température :

Le calcul se fera ainsi :  $H = \frac{V_{\text{eau}}}{m} * d_{\text{eau}}^T$

m : masse de la matière végétale mise dans le ballon



**Figure IV.1 :** Montage de Dean et Stark [26].

Nous avons pesé 10g de la poudre des feuilles d'inule visqueuse et nous avons ajouté du xylène, comme l'échantillon était peu humide, nous avons ajouté dans le décanteur avant le début de l'évaporation 1 mL d'eau distillée pour arriver aux graduations puis nous avons soustrait le volume d'eau ajouté à celui lu à la fin de la récupération.

Nous avons obtenu 0,4mL d'eau, la température de laboratoire était de 22°C.

La densité de l'eau à 22°C est environ 0.99996, on prend  $d=1$ .

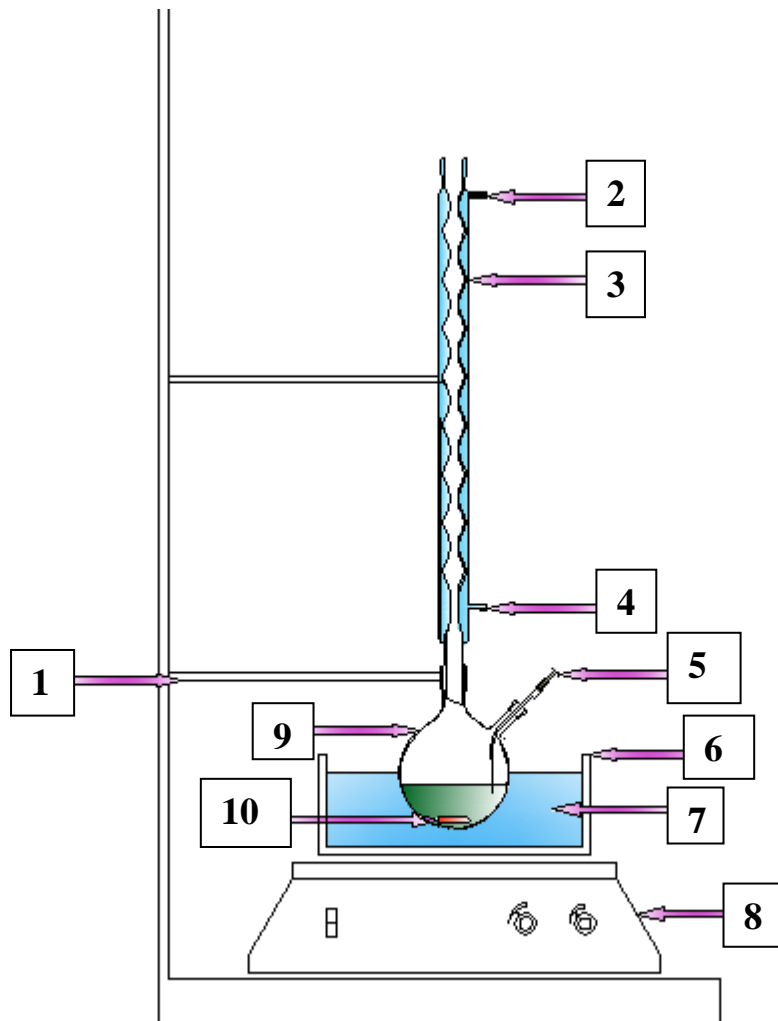
Donc :  $M_s = (0,4 * 1) / 10 = 0.04$ .

L'humidité de la matière végétale est de 4% (massique).

La matière sèche représente 96%.

## IV. Extraction solide-liquide :

### IV.1 montage d'extraction solide liquide :



**Figure IV.2 :** montage d'extraction solide liquide

- 1 : support métallique.
- 2 : sortie d'eau de réfrigération.
- 3 : réfrigérant.
- 4 : entrée d'eau de réfrigération.
- 5 : seringue.
- 6 : récipient rempli d'eau.
- 7 : eau de température régulée avec un régulateur en continue.
- 8 : plaque chauffante à agitation magnétique.
- 9 : ballon.
- 10 : barreau aimanté.

## IV.2. Protocole expérimentale :

L'extraction solide-liquide consiste à extraire les polyphénols de la matière végétale à l'aide d'un mélange d'acétone-eau (75% volumique), les paramètres que nous allons varier sont :

- a- la température d'extraction « T » ; elle sera variée entre 40 et 50°C
- b- l'hydromodule ; entre 20 et 60 mLg<sup>-1</sup>.
- c- le diamètre des particules, toutes les classes de l'échantillon.

Nous allons calculer la concentration de l'extrait en polyphénols grâce la courbe d'étalonnage faite dans le chapitre III.

## IV.3. Calcul du rendement en tanin :

On calcul la masse extraite grâce à la courbe d'étalonnage.

Le rendement de l'extraction se calcule par la relation suivante :

$$R = m_{ext} / m_{vs}$$

$m_{vs}$  : Masse de la matière végétale sèche.

$m_{ext}$  : masse de l'extrait.

## IV.4. Essai préliminaire :

Comme pour chaque étude d'extraction des polyphénols végétaux, il faut réaliser un point de départ qui permet de savoir si la plante est riche ou non en polyphénols, pour cette présente étude nous avons choisi de commencer par l'optimum obtenu dans l'étude faite sur le grignon d'olive par BOUALILI et SAIDI [27] ( T = 45°C, Hydromodule = 40mL.g<sup>-1</sup>) et comme le diamètre de notre échantillon est constitué de 4 classes, on ne peut pas prendre un point central. Nous avons pensé à faire l'étude de l'influence du diamètre sur l'optimum que nous allons générer à partir des deux paramètres cités précédemment et en utilisant l'échantillon tel qu'il est après broyage.

Pour le choix du solvant nous nous sommes référés à la même étude et nous avons choisi de travailler avec l'acétone-eau (75% en volume) car le rendement était élevé et l'acétone n'est pas toxique.

Nous allons calculer le temps de contact de l'extraction, pour cela, on calcule le rendement pour différents intervalles de temps, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau IV.2

Essai : on prend 5 g de la matière végétale qu'on verse dans un ballon et on y ajoute 200 mL du mélange acétone-eau 75%. La température du bain-marie est 45°C et l'agitation

est maximale grâce à un barreau aimanté pour diminuer l'épaisseur de la couche limite mais on évite de créer une phase gazeuse qui va influencer l'extraction.

On prélève avec la seringue 0.5 mL qu'on filtre ensuite on prélève  $V_3 = 0.2$  mL après filtration qu'on verse dans un erlenmeyer (20mL) et on ajoute 15 mL d'eau distillée. Ensuite on dose cette solution de la même façon que l'étalon, l'extraction a duré trois heures et le rendement calculé est de 17.6%.

Formules de calcul :

- Concentration de l'extrait dilué ( $V_1 = 15,2$  mL) = absorbance / 0.755  
 $C_1 = \text{abs} / 0.755 \text{ g.L}^{-1}$
- Concentration de l'extrait :  
 $C_2 = C_1 * (V_1/V_3) \rightarrow C_2 = C_1 * (15.2/0.2) \text{ g.L}^{-1}$
- masse extraite ( $V_2 = 200$ ml) =  $C_2 * (V_2 / 1000)$   
 $m_{\text{ext}} = C_2 * (200/1000) \text{ g}$
- rendement massique en polyphénols % :  
 $r = (m_{\text{ext}} / m_{\text{vs}}) * 100 = (m_{\text{ext}} / (5 * 0.96)) * 100 \%$

#### IV.5. Planification des essais :

Nous varierons l'hydromodule et la température, et donc nous appliquerons le plan factoriel  $2^2$ .

Nous allons varier l'hydromodule de 20 à 60 mL.g<sup>-1</sup>, et la température de 40 à 50°C.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau IV.2

**Tableau IV.2** : résultats des essais

	essai	Variables réelles		Variables réduites		Rendement %
		T (°C)	H (mL.g <sup>-1</sup> )	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	
Plan factoriel	1	50	60	+1	+1	12,8
	2	50	20	+1	-1	15,3
	3	40	60	-1	+1	14,3
	4	40	20	-1	-1	09,7
Répétition au centre	5	45	40	0	0	17,6
	6	45	40	0	0	17,8
	7	45	40	0	0	17,6

L'équation du modèle est sous forme  $y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_{12} x_1 x_2$

Avec :  $a_0 = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n y_j \quad n = 7 \quad \Rightarrow \quad a_0 = 15.014$

$$a_1 = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_1 y_j \quad a_1 = 0.586$$

$$a_2 = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_2 y_j \quad a_2 = 0.300$$

$$a_{12} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_1 x_2 y_j \quad a_{12} = -1.014$$

$$y = 15.014 + 0.586 x_1 + 0.300 x_2 - 1.014 x_1 x_2$$

➤ **Validité du modèle :**

Un modèle mathématique ne peut être utilisé que s'il est adéquat, il est donc nécessaire de vérifier que les valeurs de Y calculés à partir d'une expression mathématique du modèle correspond bien aux valeurs déterminées expérimentalement.

Le modèle peut s'avérer inadéquat essentiellement pour les raisons suivantes :

- Le modèle ne tient pas compte d'un paramètre important
- Le degré du polynôme est insuffisant ou excessif
- L'erreur expérimentale est très importante

La qualité d'approximation donnée par le modèle est estimée par la variance résiduelle  $\delta^2_{res}$  et la variance  $\delta^2_y$  relative à la dispersion des résultats autour de leur moyenne, elle nécessite un certain nombre d'essais répétitifs

➤ **Variance résiduelle :**

$$\delta^2_{res} = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y})^2}{V_{res}} \dots \dots \dots (1)$$

$\hat{y}$  : Rendement calculé à partir du modèle

$y_i$  : rendement expérimental.

$V_{res}$ : degré de liberté :  $V_{res} = n - k \dots \dots \dots (2)$

$n$  : le nombre total d'essais dans notre cas :  $n = 7$

➤ **Variance relative :**

$$\delta^2 y = \sum_{i=1}^m \frac{(y_i - \bar{y})^2}{V_y} \dots \dots \dots (3)$$

m : nombre d'essais répétitifs.

$\bar{y}$  : La moyenne des essais répétitifs.  $\bar{y} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m y_i \dots \dots \dots (4)$

$y_i$  : résultats des essais répétitifs.

$V_y = m - 1 \dots \dots (5)$

La validité du modèle est vérifiée par le test de Fisher, qui permet d'apprécier l'écart entre  $\delta^2_{res}$  et  $\delta^2_y$

Le test consiste à comparer la valeur du rapport  $F = \frac{\delta^2_{res}}{\delta^2_y} (6)$  calculé à la valeur tabulée  $F\alpha(V_{res} - V_y)$  correspondant à un seuil de confiance de 5%

Le modèle n'est valable que si la condition  $F < F\alpha$  est vérifiée.

➤ **Application du test:**

**Tableau IV.3 :** valeurs expérimentales et valeurs calculées des rendements à partir du modèle du premier ordre

Essais	$y_i$	$\hat{y}$
1	12,8	14,9
2	15,3	16,3
3	14,3	15,7
4	09,7	13,1
5	17,6	15,0
6	17,7	15,0
7	17,6	15,0

Les expériences 5, 6 et 7 sont des essais répétitifs

**Validité du modèle :**

Les variances  $\delta^2_{res}$  et  $\delta^2_y$  sont calculées par les relations (1) et (3)

La relation (2) nous donne  $V_{res} = 7 - 4 = 3$

D'où  $\delta^2_{res} = 10.06$



$$m = 3$$

La relation (5) nous donne  $Vy = 3 - 1 = 2$

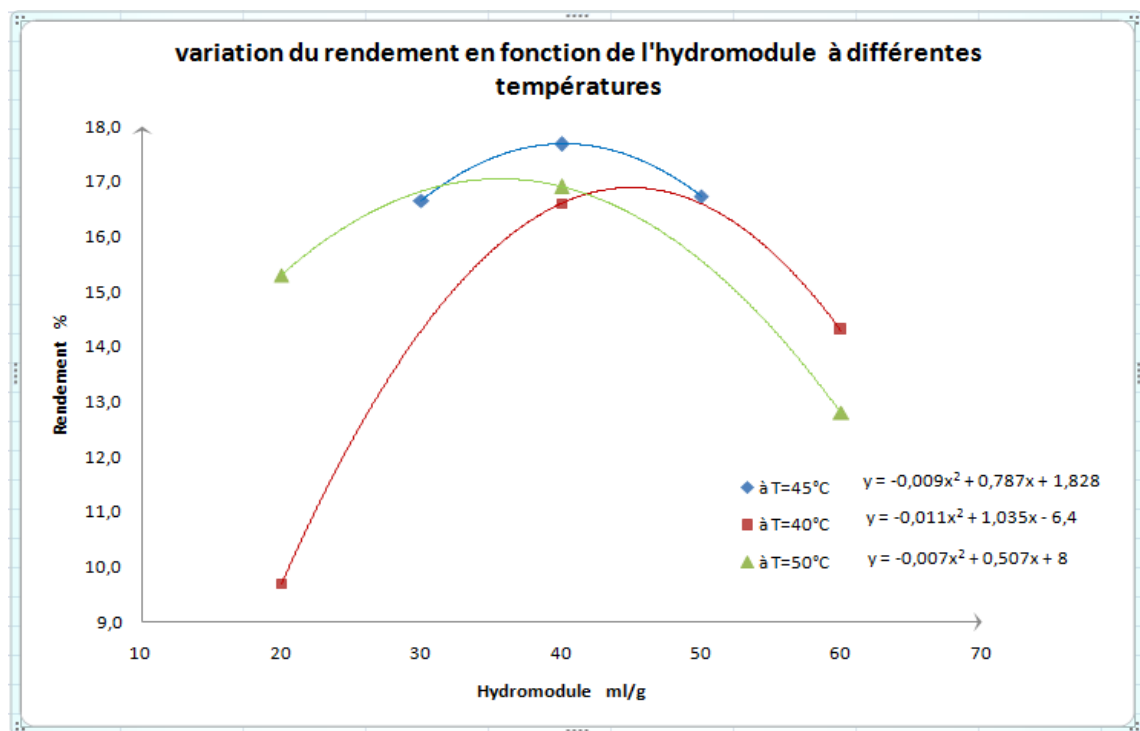
$$\delta^2y = 0.013$$

F se calcul par la relation (6)  $F = 754.69$

La valeur tabulée du test de Fisher pour les degrés de liberté  $F\alpha(3,2)$  pour un seuil de confiance  $\alpha=0.05$   $F\alpha(3,2) = 9.55$

On voit bien que  $F > F\alpha$  donc le modèle **est inadéquat**.

Nous allons essayer d'exploiter ces résultats pour approcher l'optimum en traçant l'évolution du rendement en fonction de l'hydromodule pour des températures constantes, et donc nous allons prendre comme valeur optimale le point au rendement plus élevé. Les résultats sont donnés dans la figure IV.3.



**Figure IV.3 :** évolution du rendement en fonction d'hydromodule.

Le rendement à (H=20 T=40) est supérieur à celui ou (H=20 ; T=50) cela est peut être du à la destruction des polyphénols par la température car les concentrations sont élevées, pour (H=60 ;T=40) le rendement est inférieur à celui de (H=60 ; T=50) cela est peut être du à la résistance à l'extraction dans le solide qui est moins importante à température élevée (notant aussi que les concentrations sont moins importante donc la destruction des polyphénols est moins importante). Nous remarquons qu'à (H=40) nous

avons extrait plus de polyphénols à (T=45) car il n'y a pas de destruction comme à (T=50) et la résistance est moins importante qu'à (T=40).

Pour mieux cerner l'optimum nous allons procéder à de nouvelles expériences pour déterminer le modèle du second ordre qui devrait donner de meilleurs résultats. Les essais réalisés sont portés sur le tableau IV.4.

**Tableau IV.4 :** résultats des essais.

essai	Variables réelles		Variables réduites		Rendement %
	T (°C)	H (mL.g <sup>-1</sup> )	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	
8	40	40	+1	0	17,1
9	45	60	0	+1	13,2
10	45	20	0	-1	16,6
11	40	40	-1	0	15,6

Avec ces résultats le modèle mathématique devient à l'aide du logiciel statgraphics plus:

$$y = 17.9 + 0.933 x_1 - 0.216 x_2 - 1.683 x_1^2 - 1.755 x_1x_2 - 3,133 x_2^2$$

Le nouveau modèle est validé ; les nouvelles valeurs données par ce modèle sont portées sur le tableau IV.5.

**Tableau IV.5 :** Valeurs expérimentales et valeurs calculées des rendements à partir du modèle du second ordre.

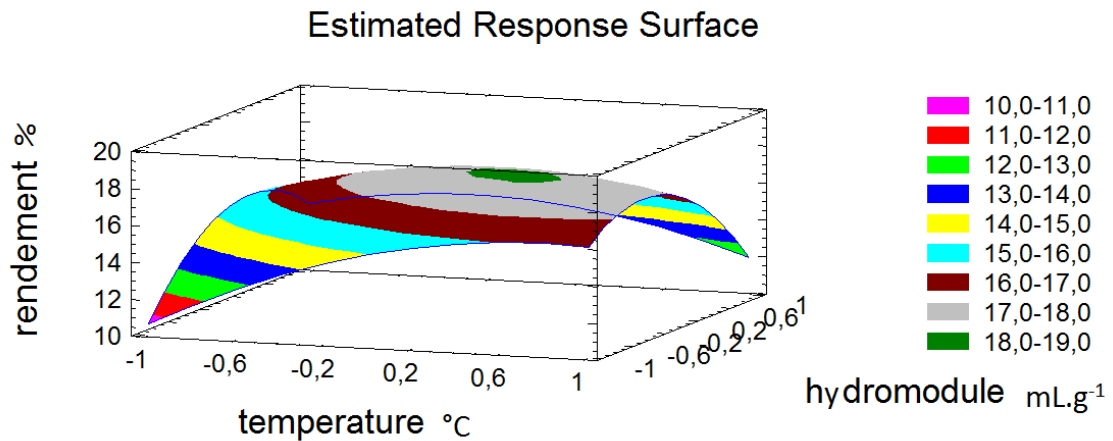
essais	y <sub>i</sub>	$\hat{y}$
1	12,8	12,0
2	15,3	16,0
3	14,3	13,7
4	09,7	10,6
5	17,6	17,9
6	17,7	17,9
7	17,6	17,9
8	17,1	17,2
9	13,2	14,6
10	16,6	15,0
11	15,6	15,3

Dans ce cas l'écart moyen entre valeurs expérimentales et valeurs du modèle est de 0.65 %

Le calcul de l'optimum a donné, (T=0.34 ;H=-0.13) correspondant à (T=46.7°C ; H=37.4 mL.g<sup>-1</sup>). Le rendement à ce point est de 18.1%.

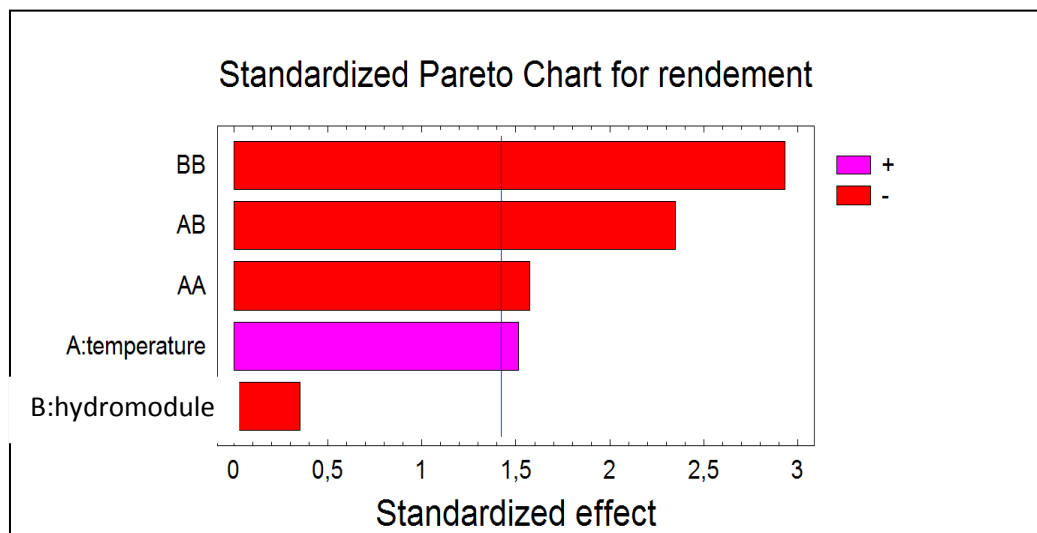
Ceci peut être visualisé par la figure IV.4.

Cet optimum est très voisin de la valeur trouvée précédemment.



**Figure IV.4 :** évolution du rendement en fonction de la température et de l'hydromodule.

On peut voir l'influence de chaque paramètre sur le diagramme de PARETO donnant la représentation des effets standardisés (figure IV.5) pour un seuil de confiance de 75%, ces effets sont significatifs s'ils dépassent le trait vertical.



**Figure IV.5 :** Représentation des effets standardisés pour un seuil de confiance de 75%.

On remarque que l'influence du coefficient  $a_2$  est négligeable donc le modèle peu s'écrire sous la forme suivante :

$$R = 17.9 + 0.933 x_1 - 1.683 x_1^2 - 1.755 x_1x_2 - 3,133 x_2^2$$

dans ce cas l'écart moyen est de 0,7 le modèle est valable

## Remarques sur l'extrait :

- Au cours des extractions la couleur des solutions obtenues sont données dans le tableau IV.7

**Tableau IV.6 :** couleurs des solutions à la fin des extractions :

Conditions d'extraction		Couleur
Température °C	Hydromodule mL.g <sup>-1</sup>	
40	60	marron doré
40	40	marron foncé
40	20	marron doré
50	60	vert clair
50	40	vert foncé
50	20	vert
45	30	vert foncé
45	40	vert foncé
45	50	vert foncé

- Les solutions diluées pour le calcul du rendement deviennent jaune doré « couleur champagne » après une journée ce qui peut être un signe d'un pouvoir antioxydant très élevé, paramètre que nous allons mesurer dans le chapitre V.

## V. Influence de la granulométrie :

Nous avons obtenu quatre classes de diamètres et nous allons faire un essai par classe au point central 45°C, 40 mL.g<sup>-1</sup>. Les résultats des essais sont exprimés dans le tableau V.1

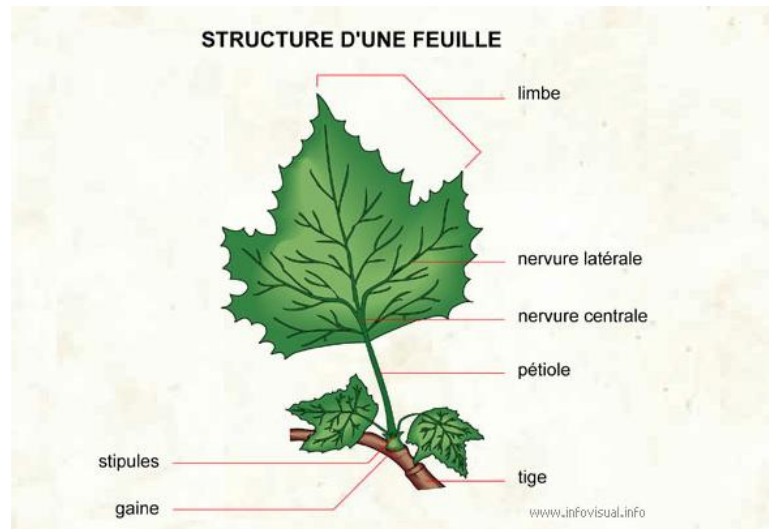
**Tableau IV.7 :** influence de diamètre des particules sur le rendement :

Diamètre de la classe µm	Fraction massique dans l'échantillon %	Rendement %
250-224	19.44	12.6
224-160	17.69	16.0
160-112	45.32	18.0
<112	17.55	21.8
Mélange	100%	17.6

Ces résultats sont prévisibles car dans les travaux précédents le rendement augmente lorsque le diamètre des particules diminue.

Nous avons réalisé l'extraction avec une agitation maximale et donc la résistance au phénomène de diffusion se situe au niveau de la particule.

La classe (250-224  $\mu\text{m}$ ) est constituée essentiellement des pétioles, nervures centrales et latérales (représenté dans la figure V.1) car c'est la partie la plus difficile à broyer, tandis que la classe ( $< 112 \mu\text{m}$ ) est constituée de limbe « riche en chlorophylle qui donne la couleur verte»



**Figure IV.6 :** différentes partie d'une feuille

En plus de l'augmentation de la surface d'échange, nous pensons que les limbes contiendraient plus de polyphénols.

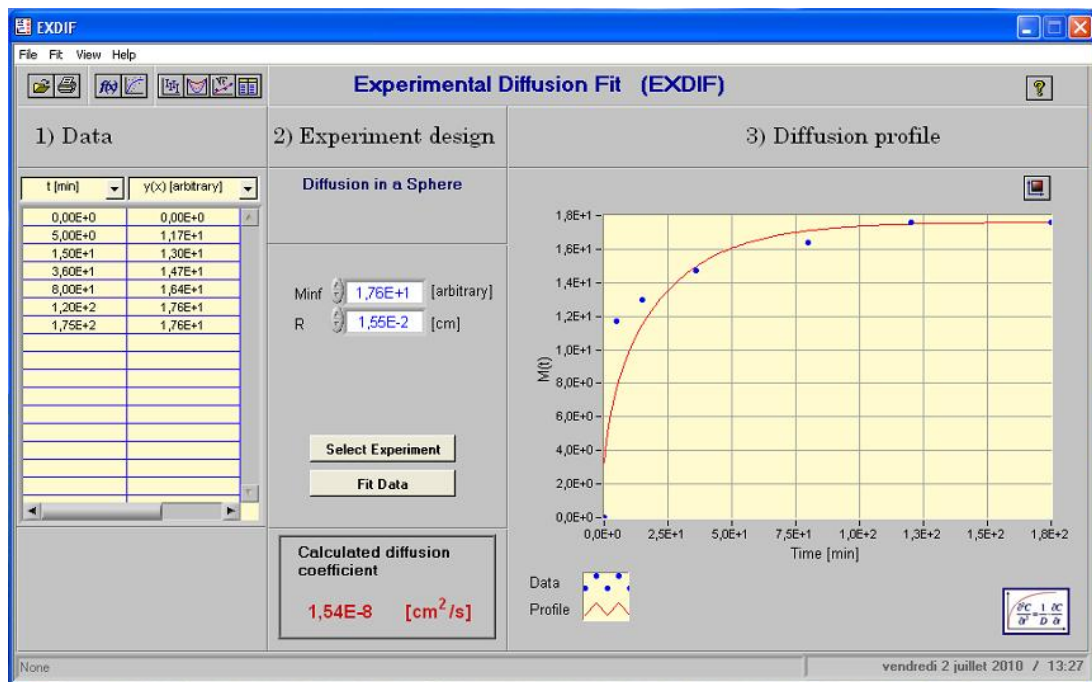
## VI. Etude de la cinétique d'extraction

Nous avons suivi la cinétique de l'extraction au point central (45°C, 40ml/g) le tableau V.1 donne l'évolution du rendement en fonction du temps :

**Tableau IV.8 :** évolution du rendement de l'extraction des polyphénols en fonction du temps

Temps (mn)	0	5	15	36	80	120	175
Concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )	0	2,818	3,12	3,523	3,935	4,228	4,232
Rendement %	0	11.7	13.0	14.7	16.4	17.6	17.6

Le calcul du coefficient de diffusion est donné par le logiciel Exdiff dans la figure VI.1



**Figure IV.7 :** Calcul du coefficient de diffusion par le logiciel Exdif (T=45°C ; H=40mL).

**L'équation du calcul :**

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \cdot e^{-\frac{D n^2 \pi^2 t}{R^2}}$$

**Dans notre cas :**

$M_t$  est le rendement à l'instant t.

$M_\infty$  est le rendement maximal « nous l'avons à 17,6%).

D est le coefficient de diffusion.

R le rayon de la sphère.

t le temps.

Nous remarquons que la vitesse de l'extraction est très élevée, après 5 min le rendement atteint 11,7% , ensuite le vitesse diminue et se stabilise à 2h pour un rendement de 17,6%.

L'exploitation de ces résultats par Exdif, qui est un logiciel de traitement des phénomènes de transfert de matière dans un solide a permis de déterminer l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion des polyphénols dans le solide.

Le coefficient de diffusion est égal à  $1,52 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

# CHAPITRE V

Extraction des polyphénols de la phase aqueuse  
et Evaluation de l'activité antioxydante

## I. Introduction :

Pour pouvoir valoriser notre extrait de polyphénol, nous devons d'abord éliminer l'acétone par une distillation sous vide ensuite isoler les polyphénols présents dans l'eau par une extraction de liquide liquide en ajoutant un solvant organique « l'acétate d'éthyle » et en fin par décantation et élimination de l'acétate d'éthyle par une distillation sous vide

## II Récupération de l'acétone :

**Suite aux travaux de AMA [28 ]** , nous avons pris 690 ml de l'extrait au point centrale constitué d'environ 75% en volume d'acétone, et nous avons fait une distillation sous vide avec le montage que nous avons réalisé selon le schéma porté sur la figure n°V.1

Au bout de deux heures la séparation de l'acétone était totale, nous avons récupéré 483 ml d'acétone pur et 178 mL de solution aqueuse contenant les polyphénols, nous avons perdu donc  $690 - (483+178) = 29$  mL soit environ une perte de 6%.

### Discussion :

Cette perte est due en partie à la pompe à vide qui est très puissante, mais nous avons récupéré 178 mL de solution aqueuse à la place des 172 mL prévues cela est dû à la teneur en acétone qui a varié à cause de son évaporation dans l'échantillon au cours de l'extraction solide liquide et au cours du stockage.

### Montage de distillation sous vide :

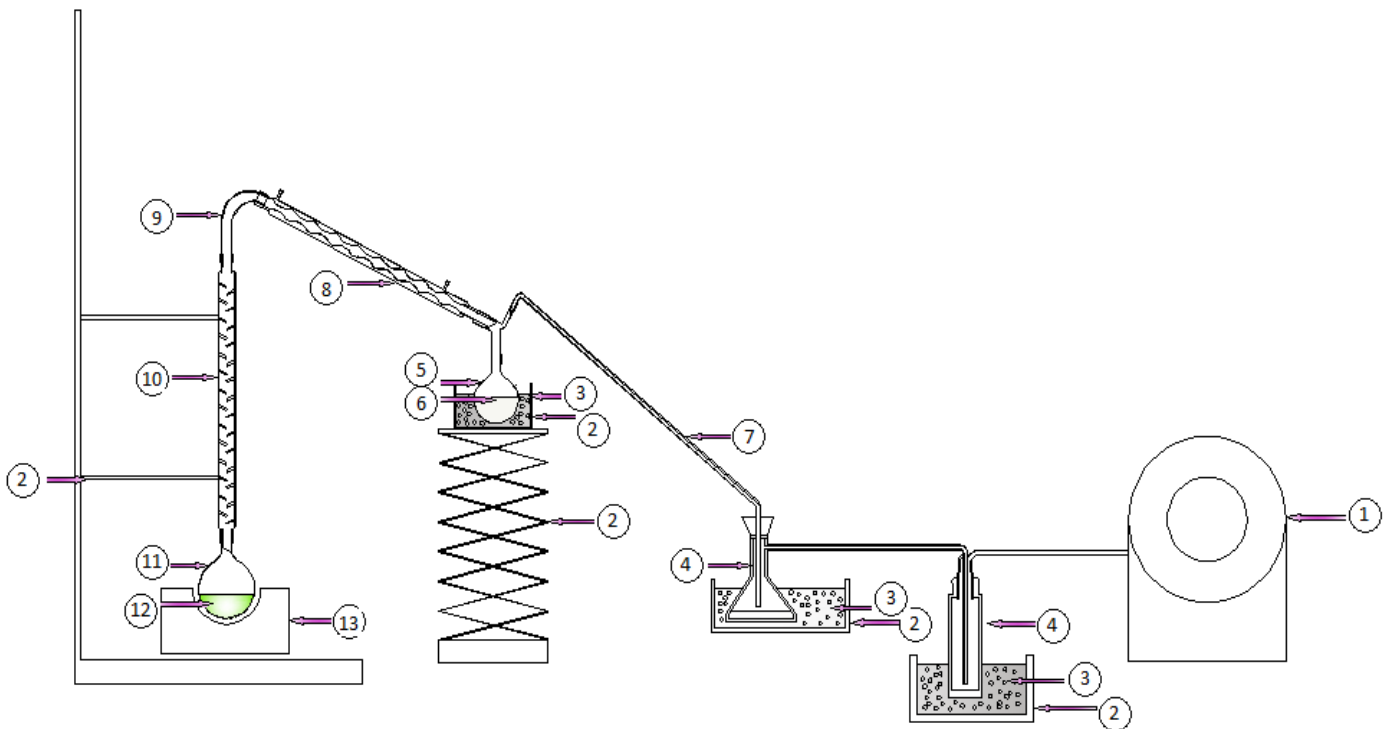


Figure V.1 : montage de la distillation sous vide



- 1 : pompe à vide.
- 2 : support, récipient.
- 3 : eau + glace.
- 4 : piège.
- 5 : ballon de 500 ml.
- 6 : acétone pur.
- 7 : tube en verre.
- 8 : réfrigérant.
- 9 : coude.
- 10 : colonne.
- 11 : ballon de 1000mL.
- 12 : extrait : eau + acétone + polyphénols...
- 13 : chauffe-ballon.

## **II. Extraction des polyphénols de la solution aqueuse par l'acétate d'éthyle :**

Après avoir éliminé l'acétone, la solution aqueuse obtenue (178mL) est lavée avec l'acétate d'éthyle trois fois (70% en volume d'acétate d'éthyle).

La procédure est la suivante :

30% → 178 mL

70% → v →  $v = (178 \cdot 70) / 30$  donc  $v = 415$  mL

Le calcul de la densité optique

La concentration initiale ( $C_0$ ) des polyphénols dans la solution aqueuse est calculée avec la courbe d'étalonnage,  $C_0 = 20.571 \text{ g.L}^{-1}$  → 100 %

Après le premier lavage, nous avons récupéré 172 ml de solution aqueuse de concentration ( $C_1$ ) en polyphénols,  $C_1 = 16.955 \text{ g.L}^{-1}$  → 82.4 %

Après le deuxième lavage, le volume de la solution aqueuse est de 170 ml de concentration ( $C_2$ ) en polyphénols,  $C_2 = 9,974 \text{ g.L}^{-1}$  → 48,48 %

Après le troisième lavage, le volume de la solution aqueuse est de 166ml de concentration ( $C_3$ ) en polyphénols,  $C_3 = 7,176 \text{ g.L}^{-1} \rightarrow 34,88 \%$

1 : ampoule à décanter

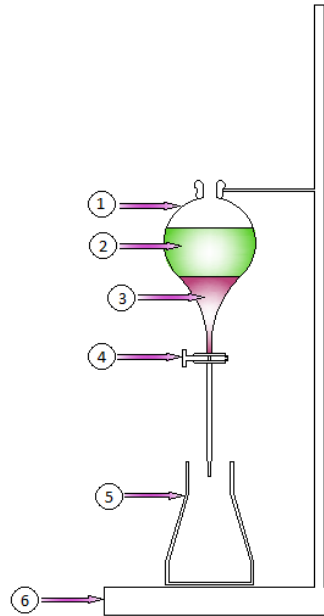
2 : phase organique

3 : phase aqueuse

4 : robinet

5 : erlenmeyer

6 : support



**Figure V.2 :** montage de séparation liquide-liquide (décantation)

**La masse extraite calculée par la courbe d'étalonnage est :**

$$M_4 = M_0 - M_3$$

$$M_i = (C_i * v_i)/1000$$

$$M_0 = 3,661 \text{ g}$$

$$M_1 = 2,916 \text{ g}$$

$$M_2 = 1.696 \text{ g}$$

$$M_3 = 1,277\text{g}$$

$$M_4 = \mathbf{2,38 \text{ g}}$$

$M_0$  masse de polyphénols dans 178 ml d'eau après élimination de l'acétone calculé avec la courbe d'étalonnage.

$M_1$  la masse restante après le 1<sup>er</sup> lavage avec l'acétate d'éthyle.

$M_2$  masse restante après le 2<sup>ème</sup> lavage.

$M_3$  masse restante après le 3<sup>ème</sup> lavage.

$M_4$  la masse extraite par l'acétate d'éthyle ( $M_4=M_0-M_3$ )

La masse que nous avons pesé après distillation sous vide de l'acétate d'éthyle est :  $M_5 = \mathbf{2.7832 \text{ g}}$ , si on considère que cette pâte est à 2% est de solvant soit  $\mathbf{0.056 \text{ g}}$  alors la différence représente les pigments et ... :  $M_5-(M_4+0.056)= \mathbf{0.35 \text{ g}}$

$\rightarrow \mathbf{12.57 \%$  de la masse d'extraite

L'extrait récupéré après extraction liquide liquide contient 85,43% de polyphénols.

### III. Pouvoir antioxydant :

L'étude sur le pouvoir antioxydant faite par AMARI et DERGAM [29] peut être résumé par:

le pouvoir antioxydant de la Vitamine (E) et la Vitamine (C) a été déterminé à partir du pourcentage d'inhibition du radical oxydant (DPPH), les résultats sont donnés dans le tableau III et portés sur la figure 17. L'évaluation de cette activité est comparée avec d'autres molécules antioxydantes de référence BHT (antioxydant chimique puissant utilisé dans le domaine de l'agroalimentaire et pharmaceutique) et Quercétine (antioxydant naturel moins puissant, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>).

Nous avons fait la même étude sur notre extrait d'inule visqueuse et nous avons comparé avec les résultats obtenus par AMARI H., DERGAM R [ 29].

- **Principe :**

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode de DPPH ou 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyle agit en tant qu'un radical libre stable (DPPH°) efficace réduit par un antioxydant, montrant un spectre d'absorption à 517 nm avec une couleur violette, la réduction de ce radical nous donne la coloration jaune (Dong-Sun Lee et al, 2001).

La réaction de la réduction de DPPH° Avec les composés antioxydants est montré dans la figure III.1 :

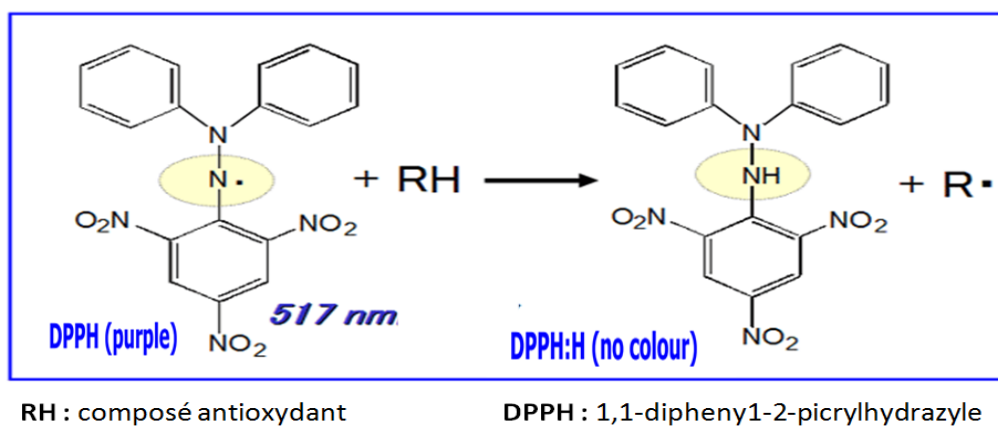
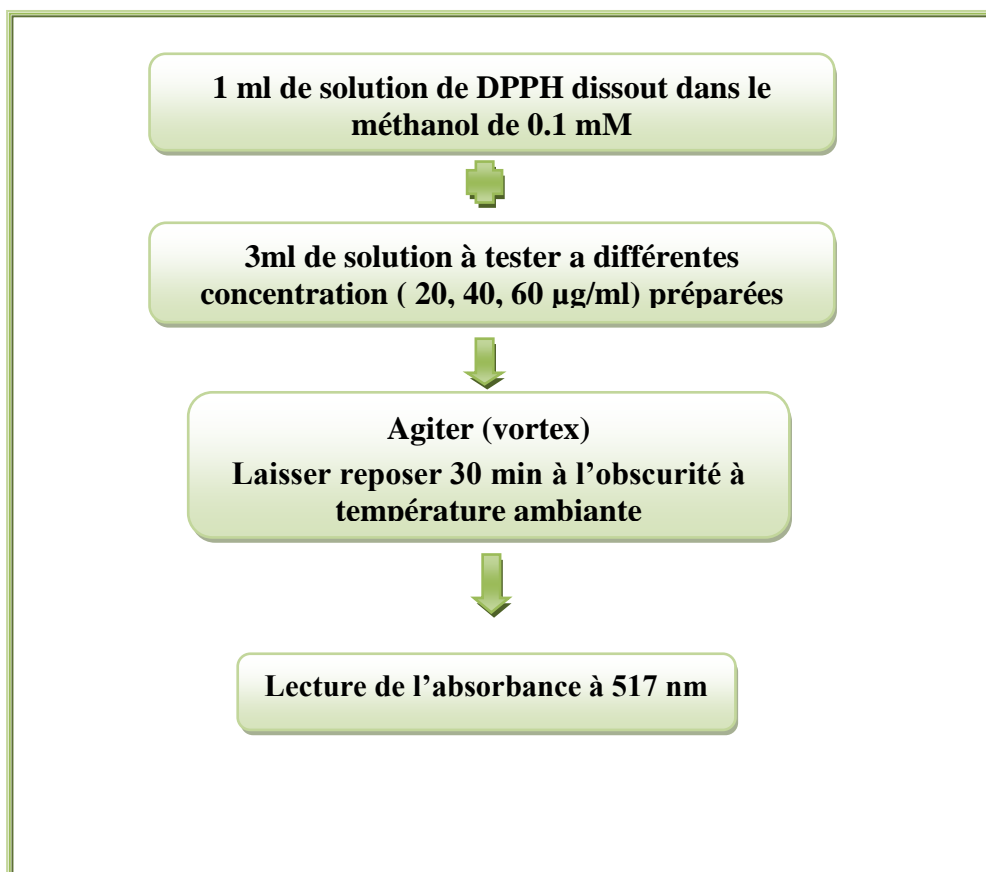


Figure V.3 : La réaction de la réduction de DPPH° avec les composés antioxydants

- **Mode opératoire :**

L'activité de piégeage des radicaux libres d'extraits d'inule visqueuse, vitamine C et la vitamine E est décrit selon Blois [30] avec quelques modifications :



(en parallèle : faire une solution de référence avec BHT et QUE)

On calibre à l'aide d'un blanc de methanol.

La capacité d'éliminer le radical DPPH a été calculé selon l'équation suivante:

$$\% I = [(AC - AS) / AC] \times 100$$

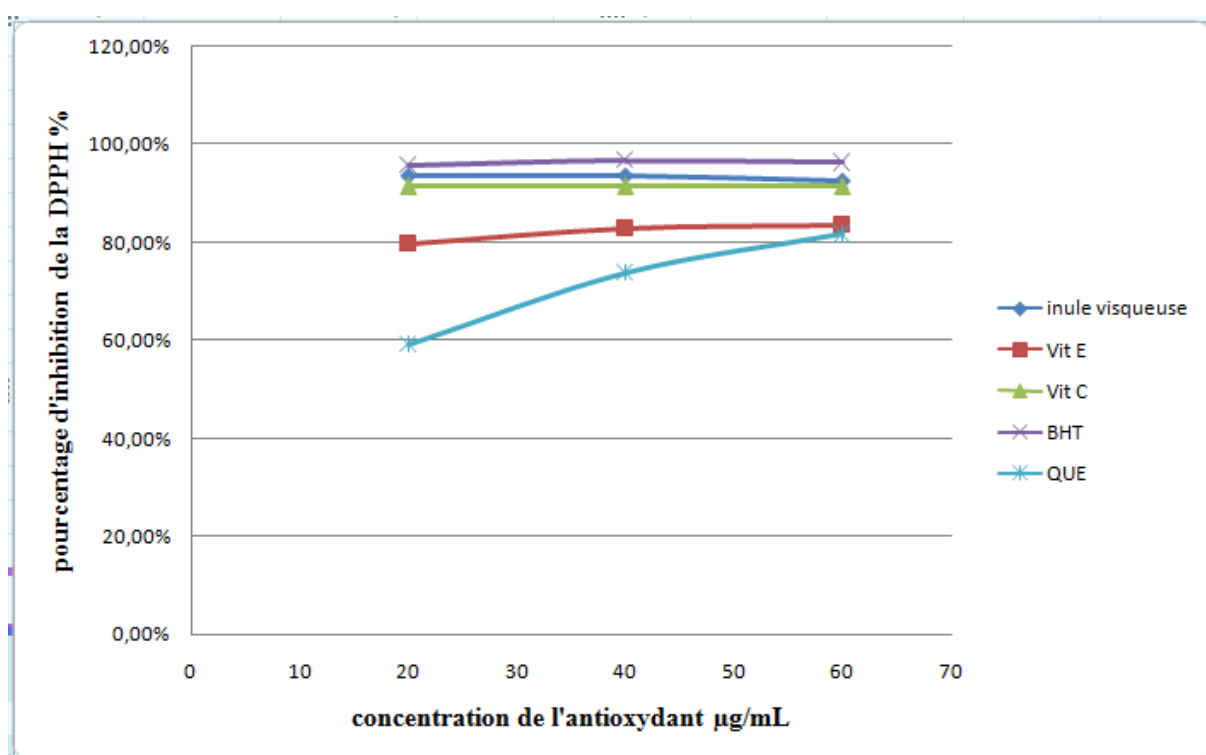
AC est l'absorbance de la réaction de contrôle et AS a été l'absorbance en présence de l'échantillon.

Le pouvoir antioxydant est enregistré comme suit : **BHT** > **extrait d'inule** > **Vit C** > **Vit E** > **QUE** ( **tableau III.1** ). Ces résultats indiquent que notre extrait a un effet notable sur les radicaux libres.

**Tableau V.1 :** pourcentage d'inhibition de radical DPPH par le GSE, vita E et C.

[Molécules] ( $\mu\text{g/ml}$ )	20	40	60
Extrait d'inule	93,6%	93,6%	92,0%
Vit E	79,8 %	82,9 %	83,5 %
Vit C	91,46 %	91,46 %	91,46 %
BHT	95 ,73%	96,75%	96,34%
QUE	59 ,14%	73,78%	81,70%

La capacité antioxydante de notre extrait ne varie presque pas avec la concentration.



**Figure V.4 :** Pourcentage d'inhibition de DPPH par les antioxydants

Remarque, cette figure montre bien que le pouvoir antioxydant de notre extrait d'inule visqueuse est très proche de BHT.

### Conclusion :

L'extrait de polyphénol isolé présente une activité antioxydants intéressante puisque celle-ci se situe entre deux antioxydante utilisé dans l'industrie.

**CONCLUSION**

Nous avons pu démontrer par étude que l'Inule visqueuse est bien valeureuse.

L'extraction Solide-Liquide nous a donnée un optimum ( $T=46,7^{\circ}\text{C}$  ;  $H=37,4\text{mL.g}^{-1}$ ) très proche du point central ( $T=45^{\circ}\text{C}$  ;  $H=40\text{mL.g}^{-1}$ ). Le rendement au point centrale est de 17,7%.

La méthode colorimétrique de FOLIN CIOCALTEU ne fait pas de différences entre les polyphénols et d'autres composés phénolique donc une HPLC est nécessaire pour déterminer la composition chimique de l'extrait, cela n'est pas fait car nous n'avons pas le matériel qu'il faut.

Nous avons pu avoir un broyage poussé des feuilles la plante, ce qui nous a permis de voir l'influence de la granulométrie sur le rendement, le meilleur rendement est obtenu pour les particules de diamètre inférieur, il est de 21% pour le point central.

L'extrait récupéré lors de l'extraction Solide-Liquide a subi une extraction Liquide-Liquide pour isoler les polyphénols.

L'échantillon récupéré s'avère contenir 80% (massique) de polyphénols, celui-ci présente une activité antioxydante située entre celle du BHT (antioxydant chimique puissant utilisé dans le domaine de l'agroalimentaire et pharmaceutique) et la Quercétine.

### **Perspectives :**

Pour attendre les polyphénols avec une plus grande pureté, nous proposons de faire l'extraction Liquide-Liquide avec d'autres solvants organiques et de déterminer les conditions optimales.

# BIBLIOGRAPHIE

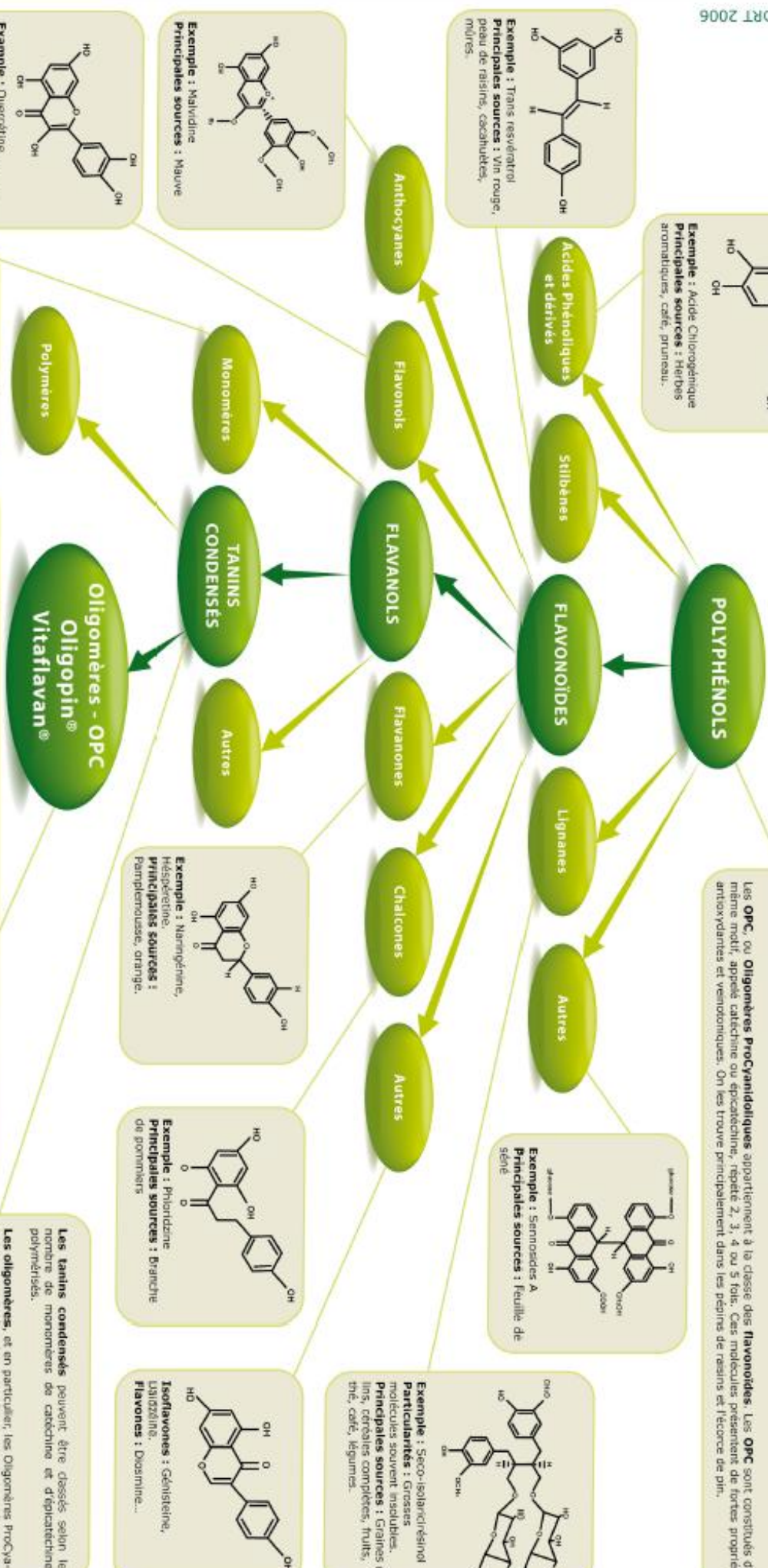


- [1] : **E.Werker, E. Putivesky, U. Ravid**; Annals of botany, p 793-801, 1985.
- [2]: **Jean-Baptiste, Augustin Pyramus** ;  
Flore française .vol. 4 Copie de l'exemplaire univ. Lausanne, p 147-156, 2008.
- [3]: **Site web** : [www.chipchaseplants.co.uk/.../I.html](http://www.chipchaseplants.co.uk/.../I.html).
- [4]: **Site web** : [www.maltawildplants.com/ASTR/Inula\\_crithmoide](http://www.maltawildplants.com/ASTR/Inula_crithmoide).
- [5]: **Site web** : [www.malta\\_wildplants.Com](http://www.malta_wildplants.Com)
- [6]: **Site web** : « [http://fr.wikipedia.org/wiki/Inule\\_visqueuse](http://fr.wikipedia.org/wiki/Inule_visqueuse) »
- [7]: **Susplugas.C.; Balansard.G. Julien.J**; « Evidence of anthelmintic action of aerial part from Inula viscosa » Ait. Herba Hung, p: 19-33, 1980.
- [8]: **F.G. Levraut** ;Dictionnaire des sciences naturelles vol. 23 Copie de l'exemplaire l'Université du Michigan Numérisé 550 -559,2007.
- [9]: **Site web** : [http://crdp2.ac-besancon.fr/flore/flore/nom\\_com/inules.htm](http://crdp2.ac-besancon.fr/flore/flore/nom_com/inules.htm), page web.
- [10]: «Dictionnaires Larousse Expression» version téléchargeable par internet.
- [11] : **Site Web** [www.polyphenols/opc.com](http://www.polyphenols/opc.com) réalisé par Novaldi
- [12] : **J BRUNETON** « pharmacognesie, phytochimie, plante médicinales »  
ed médicales internationale, 1999
- [13]: **E HASLAM** « pratical polyphenolic :from structure to molecular recognition and physiological function»Cambridge university press,UK, 1998
- [14]: **A .E.HAGERMAN** : «tannin handbook. Department of chemistry and biochemistry» Miami University. 2001
- [15] : **R DUVAL**. « Dictionnaire de la chimie et ses applications», 3 ed , paris,1978
- [16] : [http://www.leuromag.com/Les-polyphenols-ces-substances-vegetales-qui-preservent-notre-sante\\_a1966.html](http://www.leuromag.com/Les-polyphenols-ces-substances-vegetales-qui-preservent-notre-sante_a1966.html)
- [17]: Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
- [18] : <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.html>.

- [19] : **J.D. REED, P.J. HORVATH, P.J VAN SOEST, M.S. ALLEN.** « Gravimetric determination of soluble phenolics including tannins from leaves by precipitation with trivalent ytterbium ». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36:255-261,198
- [20] : **K.T. CHUNG, J.Y.WONG, C. LWEI,Y.WENHUNGAND.** « tannins and human health» *Critical reviews in food science and nutrition* Vol.38.n°6, 1998
- [ 21] : **JEAN- JACQUES MARCHEIX .** « les composés phénoliques des végétaux
- [22] : **Ribéreau-Gayon** «Les composés phénoliques des végétaux». Editions Dunod, Paris 254 pp 1968
- [23] : D'après V.L SINGLETON et S.A ROSSI (1965), modifié par F.R MONTREAU. J.BLOUIN et COLL (1972)
- [24] : **Pr. J. Vercauteren.** « *Plan du cours de Pharmacognosie - Formation Commune de Base* » édition 2007 page 64
- [25] : **G. SRISUWAN.** « Extraction solide-liquide en colonne puisée à disque et couronnes : Modélisation et application au cas des tanins ». Thèse doctorat. INP, Toulouse.1988
- [26]: **Site web:** [http://fr.wikipedia.org/wiki/Appareil\\_de\\_Dean\\_Stark](http://fr.wikipedia.org/wiki/Appareil_de_Dean_Stark).
- [27]: **N.BOUALILI et R.SAIDI** «extraction et valorisation des Polyphénols du Grignon d'Olive » PFE Ingénieur en Génie Chimique, ENP,2009.
- [28] : **AMA** «valorisation des sous produits de l'écorce du pin» PFE magistère »ENP 2002
- [29] : **AMARI H., DERGAM R.** « Etude de l'effet de la vitamine (E et C) et l'extrait de pépin de raisin (GSE) sur l'activité de l'iNOS chez un model animal de neuroinflammation » PFE Master en Biotechnologie et Pathologie Moléculaire, USTHB, 2010.
- [30] : **Blois M.S., (1958)** : Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* :26 ,1199-1200.

# Il y a Polyphénols et... Polyphénols...

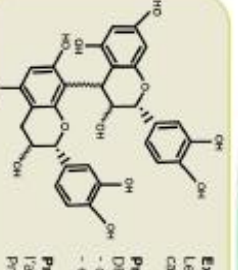
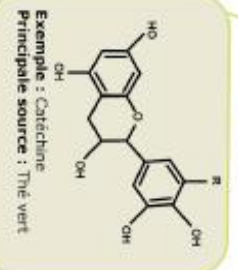
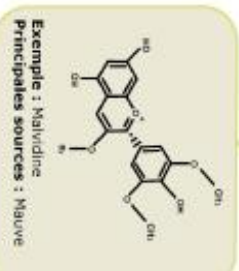
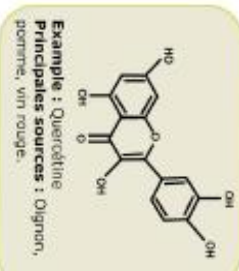
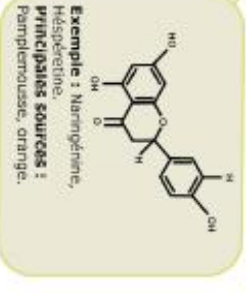
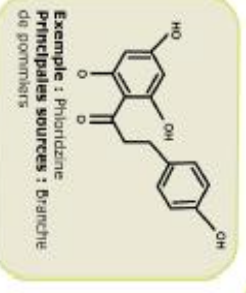
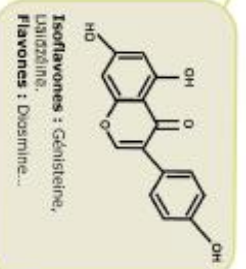
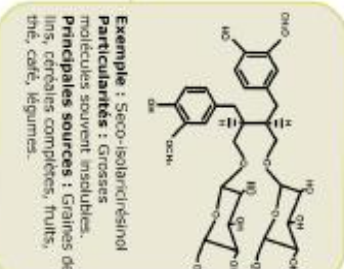
© DRT 2006



Les **Polyphénols** sont des molécules synthétisées par les végétaux pour se défendre des agressions environnementales. Les **polyphénols** forment une vaste famille qui comprend plusieurs milliers de molécules différentes présentes dans divers aliments tels que le chocolat, le vin, le raisin, le thé vert, les oignons...etc. Ils sont utilisés en agroalimentaire comme additif, ainsi que dans les compléments alimentaires et les cosmétiques.

Les **Polyphénols** ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique : certains polyphénols sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, d'autres agissent comme des hormones (les phytoestrogènes), certains encore démontrent une activité anti-inflammatoire.

Les **OPC**, ou **Oligomères ProCyanidoliques** appartiennent à la classe des **Flavonoïdes**. Les **OPC** sont constitués d'un même motif, appelé catéchine ou épicatechine, répété 2, 3, 4 ou 5 fois. Ces molécules présentent de fortes propriétés antioxydantes et veinotoniques. On les trouve principalement dans les pépins de raisins et l'écorce de pin.



**Principales sources :** Écorce de pin maritime et pépins de raisins blancs.  
DRT extrait les OPC à partir de ces deux sources pour produire :  
- oligopin® - Polyphénols totaux > 96 % - OPC > 67 % (GPEC)  
- et vitaflavan® - Polyphénols totaux > 96 % - OPC > 75 % (GPEC).

**Propriétés :** Fort pouvoir antioxydant - prévention cardiovasculaire ; diminution de l'aggrégation plaquettaire, protection des LDL contre l'oxydation - veinoprotection, protection et beauté de la peau - anti-âge - dépigmentation - prévention solaire.

Les **tanins condensés** peuvent être classés selon le nombre de monomères de catéchine et d'épicatechine polymérisés.

Les **oligomères**, et en particulier, les Oligomères ProCyanidoliques, dimère à pentamère, sont des molécules de faible poids moléculaire, elles sont bien absorbées et démontrent de multiples activités biologiques.

Les **polymères**, de poids moléculaire plus importants, sont, très faiblement absorbés et ne présentent, par conséquent, qu'une très faible activité biologique. Ils peuvent dans certaines conditions jouer le rôle de facteurs anti-nutritionnels en dénaturant certaines protéines et enzymes. C'est pourquoi, ils sont éliminés par DRT alors qu'ils sont souvent majoritaires dans les extraits dont la purification n'est pas assez aboutie.

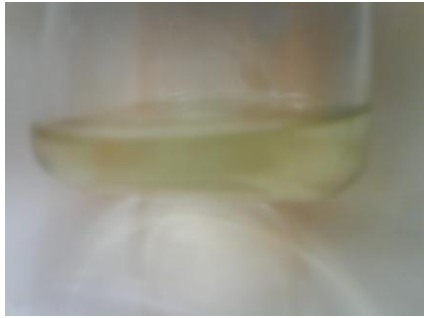


www.drtnutraceutics.com



L'extrait pâteux dissout dans le méthanol ( $200\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

« La couleur verte des pigments apparait bien».



L'extrait pâteux dissout dans le méthanol ( $60\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

« La couleur verte des pigments apparait».



L'extrait pâteux dissout dans le méthanol ( $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ )



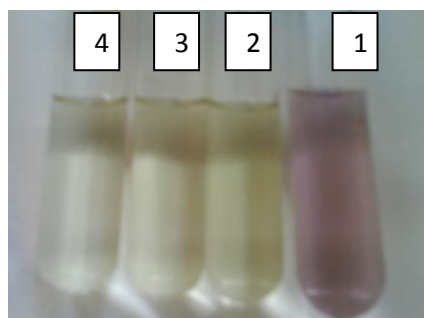
L'extrait pâteux dissout dans le méthanol ( $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

La couleur verte est presque invisible



DPPH dissout dans le méthanol ( $300\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

La couleur est violette foncée



1 : solution témoins « DPPH + Méthanol » absorbance après 30 mn : 0,188.

2 : solution « DPPH + extrait( $60\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) après 30mn absorbance = 0, 015.

3 : solution « DPPH + extrait( $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) après 30mn absorbance = 0, 012.

4 : solution « DPPH + extrait( $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) après 30mn absorbance = 0, 012.