

TP N°1: Méthodes extractives des plantes médicinales

Objectifs

- ✓ Définir quelques généralités sur la phytochimie, les métabolites secondaires, et plus particulièrement les polyphénols...
- ✓ Détailler les deux méthodes d'extraction: la macération et l'extraction assistée par ultrasons
- ✓ Estimer les quantités des composés bioactifs (polyphénols, flavonoïdes, et caroténoïdes) dans les différents extraits préparés par le calcul de facteur de l'extraction
- ✓ Choisir la meilleure méthode d'extraction, en se basant sur nos résultats

I. Rappel théorique

I.1.La phytochimie: C'est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction, ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles des plantes.

I.2.Les métabolites secondaires: Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes, ils ne sont pas directement impliqués dans le processus de croissance et de développement, mais remplissent d'autres fonctions toutes aussi importantes pour les plantes. On distingue classiquement trois grandes catégories de ces métabolites chez les végétaux:

- Les composés azotés tels que les alcaloïdes et les acides aminés
- Les terpenoides tels que les huiles essentielles, et les caroténoïdes
- Les composés phénoliques comme les polyphénols et les flavonoïdes

I.3.Quelques procédés d'extraction des composés phénoliques

Parmi les différentes étapes qui composent l'analyse et l'identification des molécules bioactives, l'étape d'extraction visant à désorber la molécule d'intérêt du site actif de la matrice végétale est essentielle car elle va déterminer la nature et la quantité de la molécule extraite, donc les étapes suivantes réussissent. L'extraction des polyphénols est généralement de type solide-liquide.

I.3.1. Macération (méthode classique):La macération est un type d'extraction solide-liquide dans lequel les composés bioactifs (solutés) à l'intérieur de la matière végétale sont extraits par un solvant spécifique sur une période de temps spécifique (heures ou même jours). Compte tenu de la simplicité de mise en place d'un système d'extraction par trempage, le trempage est le choix le plus courant pour les chercheurs. L'inconvénient de la macération est le long temps d'extraction, mais le temps d'extraction peut être raccourci par agitation. Le liquide d'immersion peut être de l'eau, de l'alcool ou d'un mélange hydro alcoolique.



Figure.1:Macération par solvant

I.3.2.Extraction assistée par ultrasons (méthode moderne): L'extraction assistée par ultrasons est une technique peu coûteuse qui peut être utilisée avec tout type de solvant et qui est facile à mettre en place. En effet, l'extraction peut être réalisée très simplement en utilisant un bain à ultrasons-qui permet également de réaliser plusieurs extractions simultanément-ou par une sonde à ultrasons associée à un agitateur. De plus, l'action mécanique des ultrasons sur la matrice végétale se traduit par une meilleure pénétration du solvant dans les cellules, d'où un meilleur transfert de masse et une amélioration des taux d'extraction et de la cinétique d'extraction.



Figure.2: Extraction assistée par ultrasons

En se basant sur les travaux précédents, les longueurs d'onde maximales spécifiques aux polyphénols ont été identifiées à 280-330 nm, aux flavonoïdes et quinones à 390-430 nm et aux chlorophylles à 600-660 nm.

II. Solvants & Matériels utilisés

Ethanol, méthanol, eau distillée	Bain à ultrasons, erlens (250 mL), agitateurs magnétiques, barreaux magnétiques, papiers filtres, pipettes graduées, tubes, entonnoirs....
----------------------------------	--

III. Mode opératoire

Le mode opératoire sera discuté au laboratoire

TP N°2: Estimation des quantités des molécules bioactives dans les extraits issus des plantes médicinales (Polyphénols & flavonoïdes)

Objectifs

- ✓ Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux par étalonnage

I. Rappel théorique

I.1.Les polyphénols: Les polyphénols sont des composés organiques ayant la caractéristique d'avoir un groupement aromatique porteur de plusieurs fonctions hydroxyles. Les substances phénoliques ont tendance à être solubles dans l'eau, ils sont le plus souvent combinés avec des sucres et ils sont généralement situés dans la vacuole des cellules végétales. Parmi les classes de polyphénols, on compte principalement les stilbènes, les acides phénoliques, les tannins, et les flavonoïdes;

I.2.Les flavonoïdes: Les flavonoïdes sont constitués de deux cycles benzéniques porteurs d'une fonction hydroxyle, reliés par une chaîne linéaire à 3C, avec un squelette carboné C6-C3-C6. Ils portent un noyau benzénique en position 2. Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo-γ-pyrone

I.3.Dosage par étalonnage

Un dosage est une technique qui permet de déterminer la concentration molaire d'une espèce chimique dissoute dans une solution. Il existe plusieurs méthodes pour doser une espèce en solution: on peut par exemple utiliser le dosage par titrage ou encore le dosage par étalonnage. C'est ce dernier type de dosage que nous allons développer.

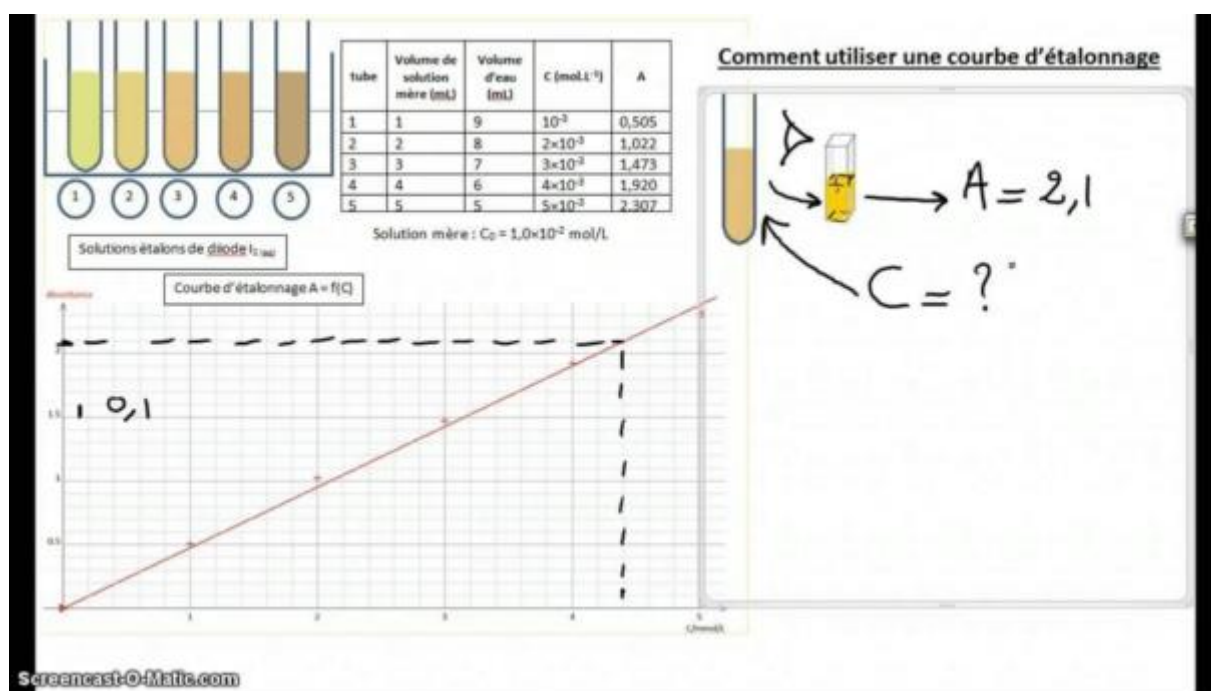
I.3.1.Principe d'un dosage par étalonnage

Le dosage par étalonnage repose sur l'utilisation de solutions (appelées solutions étalons) qui contiennent l'espèce chimique à doser en différentes concentrations connues. Il suppose

également que la concentration de l'espèce chimique influe sur une grandeur physique (comme par exemple l'absorbance) qu'il est possible de mesurer. En effet, il faut utiliser des valeurs qui sont dépendantes de la concentration. On compare ensuite les propriétés physiques de l'échantillon à la même propriété physique pour une gamme étalon.

I.3.2. Comment procéder?

Pour réaliser un dosage par étalonnage, il faut reporter sur un graphique des points dont l'abscisse correspond à la concentration des solutions connues et l'ordonnée correspond à la grandeur physique mesurée. On obtient alors une courbe appelée courbe d'étalonnage. Il suffit alors de mesurer la grandeur physique de la solution à doser afin d'obtenir un point de la courbe dont l'abscisse indique la concentration recherchée. Le graphique ci-après représente une courbe d'étalonnage linéaire (ce qui est souvent le cas).



II. Solvants & Matériels utilisés

Ethanol, méthanol, eau distillée, $AlCl_3$,
L'acide gallique, quercétine

Bain à ultrasons, erlens (250 mL), agitateurs magnétiques, barreaux magnétiques, papiers filtres, pipettes graduées, tubes, entonnoirs....

III. Mode opératoire

Le mode opératoire sera discuté au laboratoire

TP N°3: Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes

Objectifs

Extraction des chlorophylles à partir d'une algue connue (Spiruline)

Dosage des chlorophylles et des caroténoïdes de la spiruline

I. Rappel théorique

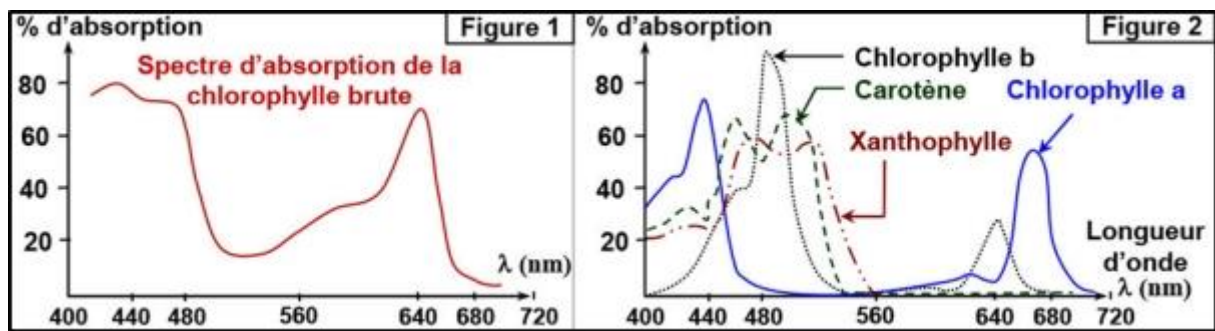
I.1.Définition des algues:

On pourrait définir les algues comme des organismes végétaux, capables de faire la photosynthèse grâce aux chlorophylles, mais qui n'ont pas acquis la reproduction évoluée des végétaux supérieurs (Embryophytes ou Archégoniates: mousses, fougères, conifères, Angiospermes).

I.2.La spiruline est une micro-algue alimentaire de couleur verte qui est très connue sous forme de poudre ou en gélules. Utilisée en cure, la spiruline a de nombreux bienfaits pour notre santé.

I.3.Les pigments chlorophylliens

La chlorophylle, de par sa couleur verte, est le principal pigment contenu dans les plantes. Elle se trouve dans les chloroplastes des cellules végétales. Elle est indispensable pour l'activité photosynthétique de la plante qui consiste à produire de l'énergie chimique (ATP) à partir de l'énergie lumineuse du soleil. En effet la lumière du soleil est captée par la chlorophylle. On distingue plusieurs formes de chlorophylles (a,b,c,d et f) qui n'ont pas la même structure chimique. Les plus courantes sont les chlorophylles A et B que l'on retrouve chez les plantes supérieures et chez les algues. Pour ce qui est du spectre d'absorption, on observe un pic d'absorption de la chlorophylle A à 430 nm (bleu) et à 660 nm (rouge). La chlorophylle B absorbe fortement à 445 nm (bleu) et 645 nm (rouge).



Spectre d'absorption de la chlorophylle

II. Solvants & Matériels utilisés

Ethanol , eau distillée, acétate de plomb	Bain à ultrasons, erlens (50 mL), agitateurs magnétiques, barreaux magnétiques, papiers filtres, pipettes graduées, tubes, entonnoirs....
---	---

III. Mode opératoire

Le mode opératoire sera discuté au laboratoire.