



Etude de l'activité antioxydante des pigments poly phénoliques naturels : cas des anthocyanes des feuilles pourpres d'*Hibiscus acetosella* Whern Ex Hiern

NDUNGI Adingite Adingite¹, Félix MATIALA MAYELE ², MUNDEKE OTOM³

¹Université de Kikwit (UNIKIK), Facultés des Sciences et Technologies, B.P.76 KIKWIT/RD Congo. Laboratoires de Chimie Analytique, Inorganique (UNIKIK) Kikwit, et de Spectroscopie de l'Université de MAKERERE /UGANDA.

² Université de Kikwit (UNIKIK), Faculté des Sciences et Technologies

³ Université de Kikwit(UNIKIK), Faculté des Sciences et Technologies

Abstract: Study of Natural Polyphenolic Pigments antioxidizing activity case of purple of anthocyanin of *Hibiscus acetosella* Whern Ex Hiern.

This work is part of the study of the antioxidant activity of the total anthocyanins of purple leaves of *Hibiscus acetosella*. The method used to measure antioxidant activity is that of free radical scavenging using DPPH. Antioxidant properties were measured and evidenced by EC₅₀ effective concentration and reduction kinetics. The results obtained indicated EC₅₀: 0.100 µg/mL while vitamin C as a control antioxidant showed an EC₅₀ of 0.0437 µg/ml. The chemical screening possesses significant anthocyanins and polyphénols as well as other compounds such as alkaloids, tannins and steroids. Starting with 40 g of purple leaves of *Hibiscus acetosella*, the reflux extraction method used resulted in 2g anthocyanins a yield of 5%. The spectrophotometric assay of total polyphenols showed that the content of the compound is 78.66 mg/L (7.87%) harvested in Kinshasa. For anthocyanins assayed by the differential absorbance method at 520 and 700 nm, at pH 1 and 4.5, the recorded values has been 55, 1 mg/L or 5.51%

Key words: Activity; Antioxidizing; Pigments; Polyphenolics; Anthocyanins.

Résumé : Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de l'activité antioxydante des anthocyanes totaux de feuilles pourpres d'*Hibiscus acetosella* Whern Ex Hiern. La méthode appliquée pour mesurer une activité antioxydante est celle du piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH et les protocoles publiés ont été discutés. Les propriétés antioxydantes ont été mesurées et mises en évidence par la concentration efficace EC₅₀ et par la cinétique de réduction. Les résultats obtenus ont indiqué l'EC₅₀ est de 0,100µg/mL alors que la vitamine C prise comme antioxydant témoin a présenté une EC₅₀ de 0,0437µg/mL. Le criblage chimique a montré que cette plante possède des anthocyanes et les polyphénols en quantité notable ainsi que d'autres composés tels que les alcaloïdes, et les stéroïdes. En partant de 40g de poudre des feuilles pourpres d'*Hibiscus acetosella*, la méthode d'extraction à reflux utilisée a conduit à l'obtention de 2g d'anthocyanes soit un rendement de 5,0%. Le dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux a montré que la teneur en ce composé est de 78,66 mg/L

(soit 7,87%) récolté à Kinshasa. Pour ce qui est des anthocyanes dosés par la méthode d'absorbances différentielles à 520 et 700 nm, aux pH 1 et 4,5, les valeurs enregistrées ont été de 55,1 mg/L soit 5,51%.

Mots clés : Activité ; Antioxydante ; Pigments ; Poly phénoliques ; Anthocyanes

Digital Object Identifier (DOI): <https://doi.org/10.5281/zenodo.13151739>

1. Introduction

Le stress oxydant et les Espèces Réactives Oxygénées (ERO) sont devenus des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé. Le milieu médical prend conscience que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plusieurs pathologies associées au vieillissement (maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète, etc.). Le stress oxydant est un déséquilibre qui conduit à l'oxydation de substrats biologiques importants (protéines, ADN, lipides, sucres) et apparaît lorsque l'organisme est confronté à des situations endogènes ou exogènes qui contribuent à augmenter de façon importante la production d'Espèces Réactives Oxygénées (ERO) dans l'organisme (J. Pince mail, Defraigne O., 2003 :3 :133-8). Les antioxydants les plus connus qui permettent à l'organisme de se défendre contre le stress oxydant sont : le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), le Super Oxyde Dismutase (SOD), la Catalase, le glutathion ainsi que le coenzyme Q (CoQ) (J. Pince mail, Defraigne O., 2003 ; 3 :133-8). Une catégorie par excellence des composés hydroxy phénoliques d'origine naturelle est celle des anthocyanes qui sont des dérivés poly hydroxylés ou poly méthoxyles des sels de flavylium (M. Andersen & M. Jordheim, 2006 : 72-80). Ils peuvent, à l'instar de coenzyme Q10, agir comme antioxydants, en passant de la forme hydroxylée à la forme quinonique (Isorez, 2007 :15-20). Entre les formes quinoniques et les formes hydroxylées, il y a des formes semi-quinoniques, comme pour le coenzyme Q10. On comprend aisément pourquoi les anthocyanes possèdent des propriétés anti oxydantes marquées. Brouillard et Kong (2003 ; 64(5): 923- 933) ont grandement contribué à la compréhension des transformations des anthocyanes en solution aqueuse. En effet, en milieu acide et neutre, on peut observer quatre structures différentes en équilibre : le sel de flavylium, la base quinonique **A**, la pseudo-base carbinol **B** et la chalcone **C**. C'est dans cette optique que nous nous proposons d'extraire, de caractériser les anthocyanes totaux de cette plante à feuilles pourpres, à savoir *Hibiscus acetosella* afin d'en étudier l'activité antioxydante en comparaison avec celle de la vitamine C, molécule de référence. L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité de résister à l'oxydation initiée par les radicaux libres (JB. Harborne, 1999:1-30; I Raskin, 2002:1608-3407; R. Williams and Crayer, 2004; 59:113-122) Cette étude se situe dans le cadre général de la recherche des pigments végétaux naturels pouvant servir comme antioxydants naturels.

1.1. *Malvaceae*

1.1.1. *Hibiscus acetosella*

1.1.2. Figures

Hibiscus est un genre de plantes à fleurs dans la famille des Malvaceae, contenant plusieurs centaines d'espèces indigènes (Lawton et Barbara P., 2004 :654-5). Les espèces membres sont souvent connues pour leurs voyantes fleurs Les fleurs rouges peuvent être infusées comme les calices rouges de la vraie oseille et soigner la fièvre et l'anémie. La racine est comestible mais insipide et fibreuse, un colorant alimentaire, les feuilles sont comestibles et mises dans l'eau peuvent soigner les douleurs chez les petits enfants. La figure suivante est l'image d'*Hibiscus acetosella*



Figure 1. *Hibiscus acetosella* (NDUNGI, 2019)

1.2. Antioxydants et anthocyanes

1.2.1. Antioxydants

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance réductrice vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices (A. Joana, Iva F. and Faria A., 2010:518-523). Les antioxydants sont capables de stopper ces réactions en chaîne en réduisant les radicaux libres, annihilant ainsi leur action et sont aussi beaucoup utilisés par l'industrie comme conservateurs pour les aliments, les cosmétiques, ou encore pour préserver le caoutchouc ou l'essence. Il existe deux sources des agents anti oxydants (W. Blot, Li JY, Taylor P., 1993 :1483-1491) ; l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes riches en vitamines C et E, en caroténoïdes, ubiquinones, flavonoïdes, glutathion ou en acide lipoïque ; L'autre est endogène et se compose d'enzymes (super oxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) ou de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine). A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certains enzymes antioxydants.

1.2.1.1. Stress oxydant

Pour fonctionner, notre organisme a besoin d'oxygène, composant essentiel pour de nombreuses réactions. Certaines de ces réactions s'accompagnent d'une libération des radicaux libres dans l'organisme ; lorsqu'ils sont produits à l'excès, ils se mettent à dégrader les protéines, les parois des cellules, l'ADN, ... Ceci provoque un désordre, un déséquilibre oxydatif appelé "stress oxydant" (C. Koechlin -Ramonalxo, 2006:165-172) . Ce désordre entraîne le vieillissement prématuré des cellules. Ainsi, diminuer le "stress oxydant" ralentit le processus de vieillissement. Le stress oxydant a été mis en cause dans des pathologies associées au vieillissement (maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète, etc.)

1.2.1.1.2. Sources

Les différentes sources sont : une mauvaise alimentation, les phénomènes inflammatoires chroniques ou aigus, les habitudes de vie non adéquates (tabagisme, consommation excessive d'alcool), la prise de la pilule contraceptive, les exercices physiques intenses ou mal gérés, une exposition inconsidérée à de grandes sources productrices d'ERO (soleil, irradiations), des interventions chirurgicales comme la transplantation d'organes et les pontages coronariens H. Sies, 1991 (J. Med, 91), 31S-38S; J.O., Defraigne, 2007 :206). La figure 2 illustre les sources du stress oxydant.

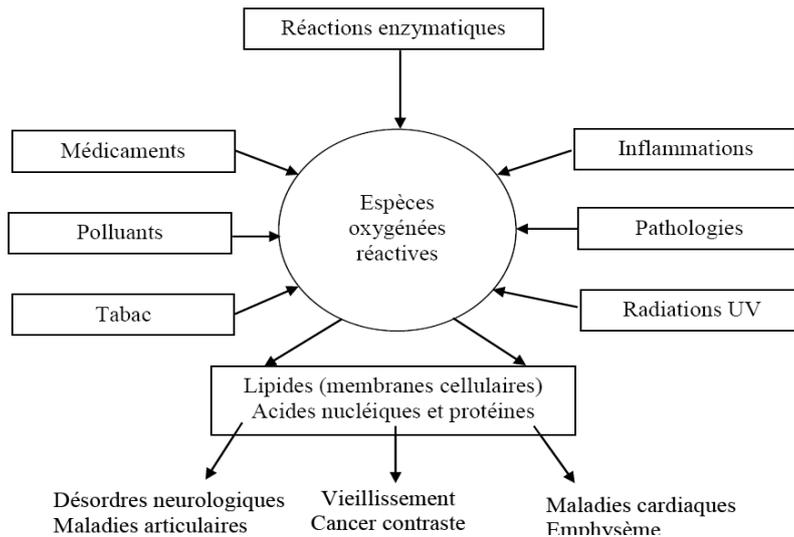


Figure 2. Sources du stress oxydant (Sies, 1991 ; Defraigne, 2007)

1.3. Tests de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage des radicaux différents, comme le peroxyde ROO- par les méthodes ORAC (oxygen radical absorbance capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxydant Parameter) (Ricardo da Silva ; *et al.*, 1991(39) :1549-1552). Les ions ferriques par la méthode de FRAP (Ferric ion Reducing antioxydant Parameter) ou les radicaux ABTS• (Sel d'ammonium de l'acide 2.2.-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (R., Re Pellegrini N., *et al.*, 1999(26):1231-1232) ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH•.

1.2. Les Anthocyanes

Très répandus dans le règne végétal, les anthocyanes sont le sujet d'un grand nombre d'études qui abordent en général les aspects concernant leur instabilité vis-à-vis des conditions dans lesquelles ils sont employés ou l'effet bénéfique de leur consommation sur la santé. Ces aspects sont particulièrement importants lorsqu'on envisage de les extraire en vue de leur utilisation comme colorant alimentaire naturel (Cheikh Beye, 2015(19)392-401). Les anthocyanes sont des métabolites secondaires des végétaux généralement localisés dans les vacuoles. Leur couleur vive attire les insectes et les oiseaux qui jouent un rôle majeur dans la pollinisation des fleurs et la dispersion des graines. Les principaux rôles physiologiques qui leur sont attribués dans la plante sont, entre autres, l'absorption des radiations néfastes pour la chlorophylle b, le transport des monosaccharides, la régulation de la pression osmotique durant les périodes de sécheresse et de froid ou la régulation de la réponse anti oxydative des plantes soumises à des facteurs de stress (Cheikh Beye, 2015(19)392-401). Ils sont particulièrement étudiés pour leur problème de stabilité notoire, l'effet positif de leur consommation sur la santé et leur potentiel en tant que colorant alimentaire naturel.

1.2.1. Principales caractéristiques des anthocyanes

Classés parmi les flavonoïdes, les anthocyanes sont caractérisés par le squelette C6-C3-C6 (Figure 3). Ce sont des glucosides formés de l'association d'un aglycone appelé anthocyanidine et d'un sucre substitué en position 3. Ces sucres sont de type mono-, di- ou tri-saccharides pouvant être acylés par des acides aliphatiques (acide malonique, succinique, etc.) ou aromatiques (acide coumarique, férulique, sinapique, etc.) .La figure suivante donne la structure des anthocyanes

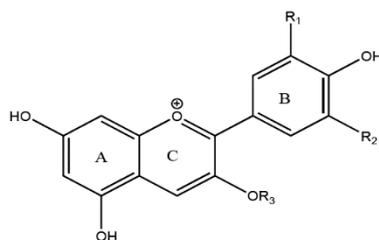


Figure 3. Structure des anthocyanes (Cheikh Beye *et al.*, 2015).

Légende : R1=R2= H, OH ou OCH3 et R3 = mono, di- ou tri saccharide

Le tableau 1 donne la structure des principaux anthocyanes

1.2.2. Tableaux

Tableau 1. Structure de 6 principaux anthocyanes

Anthocyan e	Substitution en 3'	Substitution en 5'	R1	R2	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	Couleur
Pelargonidine	H	H	H	H	516	Orange- rouge
Cyanidine	H	H	OH	H	530	Rouge
Delphinidine	OH	OH	OH	OH	541	Bleu –Violet
Peonidine	OCH ₃	H	OCH 3	H	528	Rose-rouge
Petunidine	OCH ₃	OH	OH	OCH 3	540	Bleu- pourpre
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃	OCH 3	OCH 3	538	Pourpre

Source : Cheikh Beye *et al.*, (2015)

R3 =Glucose, λ max mesuré dans le méthanol

1.2.3. Couleur des anthocyanes

Leur caractéristique la plus notable est le changement de couleur qu'accompagnent les variations de pH de leur milieu.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel végétal

Les feuilles pourpres d'*Hibiscus acetosella*, jeunes et propres à la consommation ont été récoltées chez une maraichère de KIMWENZA, dans la ville de Kinshasa. Elles ont été authentifiées à l'*herbarium* de l'INERA situé au Département de Biologie, à la Faculté des Sciences de l'Université de Kinshasa où des spécimens ont été gardés. Ces feuilles ont été séchées sous l'ombre, à l'air libre, pendant 3 semaines. Le séchage a été achevé à l'étuve, réglée à 45°C, durant 72 h. Elles ont ensuite été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention de poudre fine, qui a été gardée dans des sachets en polyéthylène propres et secs, étanches, jusqu'au moment des analyses.

2.1.2. Réactifs

Les réactifs utilisés sont :

- Réactif de BURTON (FeCl_3 2% + $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 : 1)) ;
- Réactif de SHINODA : (Alcool éthylique 95% :1 ; HCl concentré : 1 ; Eau distillée : 1 ; Copeaux de Mg (ou Zn) ;
- Réactif de STIASNY : (Formol 30% + HCl concentré : 20 :1) ;
- Réactif de DRAGENDORFF : $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$: 0,85g ; KI : 8g ; CH_3COOH glacial : 10mL ; Eau distillée : 80mL) ;
- Réactif de MAYER ;
- Réactif de BORNTRAGER : (Na OH 10% ou NH_4OH 10%) ;
- Réactif de LIEBERMAN-BUCHARDAT : (H_2SO_4 concentré + $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ (1:2) ;
- Réactif de FOLIN- CIOCALTEU : ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ + $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ;
- DPPH• ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$) ;
- Acide acétique (CH_3COOH) ;
- Acide chlorhydrique (HCl) ;
- Acétate de sodium (CH_3COONa) ;
- Sulfate de magnésium (MgSO_4) ;
- Kieselgur (Diatomite= SiO_2) ;
- Chloroforme (CHCl_3) ; Ether di éthylique (C_2H_5)₂O ; -n-Butanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) n ;
- Acide gallique ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$).

2.1.2. Appareillage

Les appareillages utilisés sont : le Soxhlet, le spectrophotomètre, le pH mètre, la balance analytique, l'ampoule à décanter.

2.2. Méthodes

2.2.1. Criblage chimique

Le criblage chimique d'une plante représente toujours la première étape de son étude chimique et permet d'orienter les recherches ultérieures. Il est fondé sur des méthodes qui permettent la détection de quelques groupes chimiques ayant des réactions générales suffisamment sensibles au point qu'une quantité réduite du matériel suffit pour le test.

2.2.1.1. Préparation des extraits aqueux

1. Préparation du macéré

15 g de poudre ont été macérés dans 250 mL d'eau distillée, pendant 24 h, sur un agitateur magnétique, puis filtrés sur papier WHATMAN 240mm. L'extrait aqueux est recueilli dans un erlenmeyer. Cette opération a été répétée deux fois afin de l'épuiser complètement.

2. Préparation de l'infusé

A 40 mL d'eau distillée bouillante, ajouter 2 g de poudre, laisser infuser pendant 30 min, puis filtrer sur papier WHATMAN 240mm.

3. Préparation de décocté

A 100 mL d'eau distillée bouillante, ajouter 6 g de poudre. Porter à ébullition et laisser bouillir pendant 15 min, puis filtrer sur papier WHATMAN 240mm.

2.2.1.2. Préparation de l'extrait organique

2 g de poudre d'*Hibiscus acetosella* ont été macérés dans 50mL de chloroforme (CHCl₃) pendant 24 h, sur agitateur magnétique, filtré sur papier WHATMAN.

2.2.2. Identification des différents groupes chimiques dans les extraits aqueux

Toutes les réactions d'identification ont été effectuées sur les trois extraits aqueux : macéré, infusé et décocté.

2.2.2.1. Recherche des polyphénols

1.1. Réactif de BURTON

La recherche des polyphénols totaux a été effectuée selon la méthode d'identification utilisée par Bruneton (1999), Cherifa BOUBEKRI (2014).

1.2. Mode opératoire

Prendre 2mL d'extrait aqueux dans un tube à essai, ajouter 2mL de réactif de Burton : en présence de polyphénols, la solution se colore en bleue intense (parfois accompagnée d'un précipité). Ensuite rechercher systématiquement les différents composés poly phénoliques (flavonoïdes, quinones, anthocyanes, tanins, etc...).

1.3. Observation

Il se développe une coloration bleue très intense, avec un précipité après essai.

2.2.2.2. Recherche des flavonoïdes

2.1. Réactif de SHINODA

La recherche des flavonoïdes a été effectuée selon la méthode d'identification des flavonoïdes utilisée par Bruneton (1999) [23], Nermin et Brunel (1995) [25].

2.2. Mode opératoire

Prendre 3mL d'extrait aqueux d'*Hibiscus acetosella* dans un tube à essais, ajouter le réactif de SHINODA, puis quelques copeaux de Mg : on observe une effervescence ; ajouter quelques gouttes d'alcool iso amylique. Agiter et laisser reposer : il apparaît dans la couche surnageant d'alcool iso amylique des colorations suivantes : rouge à rouge orangé indique la présence des flavones ; rouge cerise indique la présence des flavonols ; rouge violacé indique la présence des flavonones.

2.3. Observations

Les colorations rouge violacée, rouge orangée ont été développées respectivement lors des tests sur le macéré, l'infusé et sur le décocté.

2.2.2.3. Recherche des anthocyanes

3.1. Réactifs : HCl à 20% ; -CH₃OH-HCl à 25%

La recherche des anthocyanes a été effectuée selon la méthode d'identification des anthocyanes utilisée par NDUNGI (2019); Bruneton (1999) ., Koffi NGUSAN *et al.* (2009).

3.2. Mode opératoire :

A 5 mL de l'extrait d'*Hibiscus acetosella*, ajouter 2 mL de HCl 20% : chauffer au bain marie. En présence des anthocyanes, il peut se développer une coloration rouge violacée d'anthocyanes qui cristallise. Délayer 1g de poudre d'*Hibiscus acetosella* dans 6 mL de CH₃OH-HCl à 25%.

3.3. Observation : l'apparition d'une coloration rouge à bleue-violette va confirmer la présence des anthocyanes. On peut également observer : une coloration rouge -orange ou rose foncée.

2.2.2.4. Recherche des alcaloïdes

4.1. Réactifs de DRAGENDORFF et de MAYER

La recherche des alcaloïdes a été effectuée selon la méthode d'identification des alcaloïdes utilisée par Nermin et Brunel (1995), Koffi NGUSAN et al, 1999.

4.2. Mode opératoire : A 3 mL d'extrait aqueux d'*Hibiscus acetosella*, acidifié avec 1 mL de HCl 0,1M, ajouter quelques gouttes de réactif de DRAGENDORFF : en présence d'alcaloïdes, il se forme un précipité rouge orangé. A 2 mL d'extrait aqueux d'*Hibiscus acetosella*, acidifié avec 1 mL de HCl 0,1M, ajouter quelques gouttes de réactif de MAYER : un précipité blanc indique la présence d'alcaloïdes

2.2.3. Identification des différents groupes chimiques dans l'extrait organique

3.1. Recherche des quinones libres

1.1. Réactif de BORNTRAGER : La recherche des quinones libres a été effectuée selon la méthode d'identification des quinones libres utilisée par NERMIN et BRUNEL (1995), Koffi NGUSAN et al. 1999, NDUNGI (2019) et Bruneton (1999).

1.2. Mode opératoire

A 5 mL d'extrait organique d'*Hibiscus acetosella*, ajouter 3 mL de réactif de BORNTRAGER et agiter énergiquement : l'apparition d'une coloration allant de l'orange à rouge vif est un test positif.

3.2. Recherche des tri-terpénoïdes

2.1. Réactif : LIEBERMAN-BUCHARDAT

La recherche des tri-terpénoïdes a été effectuée selon la méthode d'identification des tri-terpénoïdes et stéroïdes utilisés par Nermin et Brunel (1995), Koffi NGUSAN et al. 1999, NDUNGI (2019).

2.2. Mode opératoire : Prendre 5mL d'extrait chloroformique d'*Hibiscus acetosella* dans un tube à essais et évaporer à sec. Ajouter 2 mL de réactif de LIEBERMAN-BUCHARDAT (une coloration violette indique la présence de triterpénoïdes et stéroïdes en mélange). Séparément, une coloration verte indique la présence des stéroïdes tandis qu'un complexe atteste la présence de triterpénoïdes.

3.3. Recherche des stéroïdes

3.1. Réactif : LIEBERMAN-BUCHARDAT

La recherche a été effectuée selon la méthode d'identification des stéroïdes utilisée par Nermin et Brunel (1995), Koffi NGUSAN et al. 1999 et Bruneton (1999).

3.2. Mode opératoire : A 5mL d'extrait chloroformique d'*Hibiscus acetosella* dans un tube à essais, ajouter 1 mL d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré : l'apparition de la coloration verte est un test positif.

2.2.4. Extraction des anthocyanes totaux

Les anthocyanes totaux ont été extraits sur les poudres de feuilles pourpres d'*Hibiscus acetosella* au Soxhlet à l'aide de l'éther di éthylique [29].

2.2.5. Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques ont été dosés par deux méthodes différentes afin de distinguer les anthocyanes des autres polyphénols. Une méthode directe utilisant les acides phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) pour le dosage des polyphénols totaux ; et une méthode spectrophotométrique en mesurant les absorbances différentielles à 520 et 700 nm pour le dosage des anthocyanes (V.L. Singleton et Rossi J.A., 1965(16):154-158).

2.2.5.1 Polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été dosés par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, décrite par Singleton et Rossi (1965). Des aliquotes (1 mL) d'extraits d'anthocyanes ou de solutions étalons d'acide gallique (20, 40, 60,80 et 100 mg/L) ont été versés dans un erlenmeyer de 25 ml, contenant 9 ml d'eau distillée. L'échantillon de contrôle a été préparé de la manière suivante : un millilitre de réactif phénolique de Folin-Ciocalteu a été ajouté au mélange et secoué. Après 5 min, 10 mL de solution de Na₂CO₃ à 7% ont été ajoutés au mélange. La solution a été diluée jusqu'à un volume de 25 mL avec de l'eau distillée et agitée. Après une incubation de 90 min à température ambiante, l'absorbance de réactif préparé a été déterminée à 750 nm avec un Spectrophotomètre UV-Visible. Les données pour la concentration des phénols totaux sont exprimées en milligrammes d'Equivalent Acide Gallique (EAG) par 100 g de masse sèche (mg EAG/100 g MS). Les valeurs indiquées sont une moyenne de trois mesures avec la mention de l'écart type.

2.2.5.2. Dosage spectrophotométrique des anthocyanes : Méthode des pH différentiels

La teneur en anthocyanes monomères totaux a été déterminée par le pH méthode différentielle (M. Giusti et R. E. Wrolstad, 2001;F12 (1-13). Les solutions tampons ont été préparées en utilisant du chlorure de potassium 0,025 M à pH 1,0 et 0,4 M d'acétate de sodium à pH 4,5.

Les absorbances des échantillons à pH 1,0 et 4,5 ont été mesurés à 700 nm et son λ max (520 nm) en utilisant Spectrophotomètre UV-vis (société Shimazu, Tokyo, Japon). Des mesures ont été réalisées en triplicats, et les résultats ont été exprimés en équivalence cyanindine-3-glucoside.

2.1 Mode opératoire : le protocole utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par Giusti et Mónica, M., & Wrolstad, R. E, 2005(19-31); M. M. Giusti, & Wrolstad, R. E. ,2003(217-22) ;. Six tubes à hémolyse en verre sont utilisés par extrait, à une concentration donnée. Trois d'entre eux sont dilués à l'aide de la solution de chlorure de potassium, tandis que les trois autres sont dilués avec la solution d'acétate de sodium. Le volume de l'extrait ne devant pas excéder 5 ml du volume total. Les tubes sont ensuite placés à l'abri de la lumière durant 15 minutes, puis les absorbances sont lues à 520 nm et à 700 nm, contre le témoin contenant de l'eau distillée.

2.3. Expression des résultats

Il s'agit ici d'un test différentiel. Ainsi l'absorbance finale est-elle obtenue par différence de l'absorbance mesurée aux différentes longueurs d'onde : $Abs = (Abs_{520} - Abs_{700})_{pH\ 1} - (Abs_{520} - Abs_{700})_{pH\ 4.5}$. Le calcul de la concentration en anthocyanes monomères totaux (AMT) permet d'obtenir des résultats qui sont exprimés en mg/L ; $AMT = \frac{Abs \times M \times DF \times 1000}{\epsilon \times l}$ avec $M = 449,2$ g/mol, masse molaire de la cyanidine-3-glycosylée ; DF : le facteur de dilution de l'échantillon analysé ; l : la longueur de la cellule de mesure en cm ; $\epsilon = 26.900$ M⁻¹ cm⁻¹ : le coefficient d'extinction molaire de la cyanidine-3-glycosylée. Les anthocyanes monomères totaux sont ensuite exprimés en mg/100 g de matière sèche (MS).

2.2.6. Etude des propriétés anti oxydantes (Piégeage du radical libre DPPH•)

2.2.6.1. Principe de la méthode

2.2.6.1.1. Réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant

Le 2,2-Diphényl 1-picrihydrazyl (DPPH•) est l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (D. Habrant, 2008: 187-191). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Fig. 3). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque ainsi la couleur bleue caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

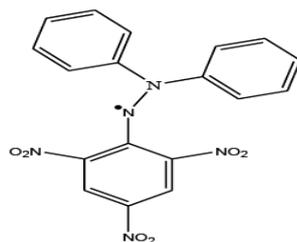


Figure 4. Structure de Le DPPH• (Habrant, 2008) [34].

La concentration en anthocyanes qui permet de réduire 50% de DPPH• (désignée par EC50) est déterminée en portant sur graphique le pourcentage de réduction de DPPH• en fonction de la concentration de l'extrait *Hibiscus acetosella*.

3. Résultats et discussion

3.1. Criblage chimique (Screening chimique)

Les résultats du criblage photochimique de la poudre d'*Hibiscus acetosella* des extraits aqueux ont révélé une quantité notable des anthocyanes, polyphénols et d'autres composés tels que les, les flavones, les flavonones, les alcaloïdes tandis l'extrait organique a révélé la présence des stéroïdes, triterpénoides etc....

3.2. Résultats d'extraction des anthocyanes totaux

Quatre essais ont été réalisés. La masse des anthocyanes obtenus après chaque extraction est reprise dans le **tableau 2** qui suit.

3.2.1. Extraction des anthocyanes totaux d'*hibiscus acetosella*

En partant de 40g de poudre des feuilles pourpres, la procédure d'extraction utilisée a permis d'obtenir une moyenne de masse des anthocyanes totaux de 2g d'anthocyanes (soit un rendement de 5%).

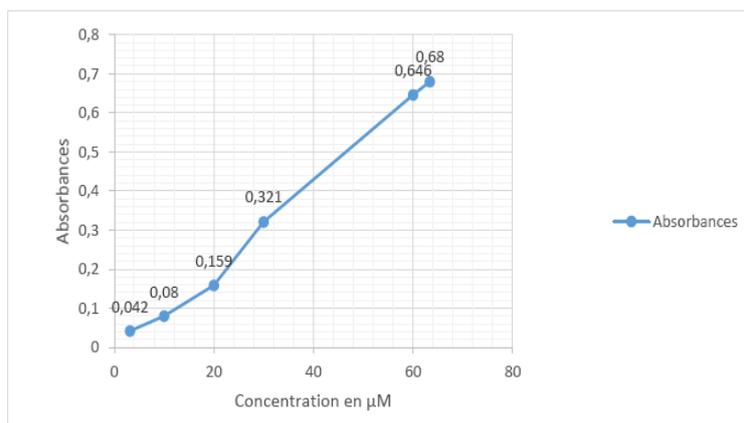
Tableau 2. Résultats d'extraction des anthocyanes totaux d'*Hibiscus acetosella*.

N° essai	<i>Hibiscus acetosella</i>
1	2
2	2,2
3	1,8
4	2
Total	8

Source : Résultats de l'auteur

3.3. Propriétés antioxydantes

En vue d'évaluer l'activité antioxydante des anthocyanes totaux, nous avons tracé au préalable une droite d'étalonnage en mettant l'absorbance en fonction de la concentration de la solution du DPPH• (Figure 5) pour connaître le coefficient d'extinction molaire de ce composé (six solutions du DPPH• ont été testés dans le méthanol pour observer la linéarité de la solution de DPPH; ce qui nous permettra de déduire sa concentration résiduelle après la mise en contact avec les anthocyanes durant un temps bien déterminé. La figure suivante indique les résultats obtenus. Pour mesurer l'activité anti oxydante des extraits anthocyaniques sous étude, au bout de 15 min de contact, on atteint un plateau qui indique que la décomposition du DPPH• n'a plus lieu. Les concentrations résiduelles du DPPH• au bout de ce temps ont été déterminées en variant les concentrations en anthocyanes et en acide ascorbique.



Concentration du DPPH en µmol.

Figure 5. Droite d'étalonnage du DPPH.

3.3.1. Dosage des composés phénoliques

1. Polyphénols totaux : La droite d'étalonnage enregistrée pour le dosage des polyphénols totaux en portant en graphique la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en acide gallique est reprise sur la figure 6 suivante.

$Y=A+BX$; A= Ordonnée à l'origine ; B= Pente ; R= Coefficient de détermination ; Les absorbances enregistrées sont respectivement de 0,74 ; ce qui correspond à des teneurs respectives en polyphénols totaux, exprimées en termes d'acide gallique, de 78,66mg/L (soit 7,87%) ; sachant que $Y=A+BX$:

$$m = \frac{0,74 - 0,00142}{0,00939} = 78,66 \text{ mg/L} ; \quad m = \frac{78,66 \times 100}{1000} = 7,87\%$$

D'après la relation $\text{Abs} = (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700}) \text{ pH } 1 - (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700}) \text{ pH } 4,5$ qui donne l'absorbance différentielle de la forme oxonium. En appliquant la relation déjà décrite $\text{AMT} = (\text{Abs} \times \text{M} \times \text{DF} \times 1000) (\text{exl})$, On trouve les valeurs reprises dans le tableau suivant avec un facteur de dilution 100 (DF = 100). Le tableau 3 donne les teneurs en anthocyanes et absorbances aux pH 1 et 4,5

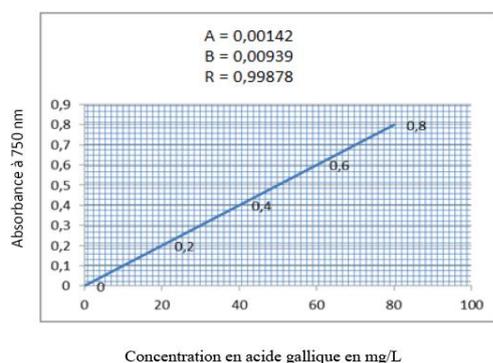


Figure 6. Droite d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux

Les valeurs obtenues par mesure spectrophotométrique sont légèrement supérieures à celles obtenues par extraction qui ont été de 5,51%. Les différences observées peuvent être expliquées par le fait qu'une extraction n'est pas toujours totale, alors que les mesures spectrales sont plus précises. $\text{Abs} = (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700}) \text{ pH } 1 - ((\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700}) \text{ pH } 4,5)$
 $= (0,443 - 0,372) - (0,348 - 0,299)$
 $\text{Abs} = (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700}) \text{ pH } 1 - ((\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700}) \text{ pH } 4,5)$
 $= (0,821 - 0,710) - (0,951 - 0,873) = 5,51\%$

On déduit les concentrations qui réduisent de 50% la concentration en DPPH• ; les valeurs trouvées des EC₅₀ sont reprises dans le tableau 4 suivant.

Tableau 3. *Teneurs en anthocyanes et absorbances aux pH 1 et 4,5*

Noms et teneurs		Absorbance pH 1,0		Absorbance pH 4,5	
Anthocyanes	Teneur en anthocyanes	λ=520 nm	λ =700nm	λ=520 nm	λ= 700nm
<i>Hibiscus acetosella</i>	55,1 mg/l (5,51%)	0,832 0,816 0,817	0,715 0,705 0,710	0,948 0,954 0,952	0,875 0,873 0,871
Moyenne	0,033	0,821	0,710	0,951	0,873

Source : Résultats de l'auteur

Légende : λ =longueur d'onde

Tableau 4. Valeurs d'EC₅₀ des anthocyanes extraits et de la vitamine C

Produits	EC ₅₀ (µg/mL)
Vitamine C	0,04375
Anthocyanes <i>Hibiscus acetosella</i>	0,100

Source : Résultats de l'auteur

3.3.2. Calcul d'EC₅₀

Pour le calcul de l'EC₅₀, on applique la formule suivante : $Ec_{50} = y - b/a$. En tenant compte du pourcentage de réduction du DPPH• ; de la concentration des extraits de *Hibiscus acetosella* et de la vitamine C prélevée dans le spectrophotomètre ; de la concentration du DPPH•. Les différentes concentrations prélevées sont les suivantes : vitamine C (28,92625 µM), *Hibiscus acetosella* (25,36 µM). La concentration du DPPH• étant de 63,4 µM, ceci nous a permis de calculer le rapport molaire de la vitamine C (0,45625) et *Hibiscus acetosella* (0,4).

En appliquant la formule $Y = a X + b$ (1) où $X = EC_{50}$

(1) devient $Y = a EC_{50} + b$, alors que $Y - b = a EC_{50}$

$$EC_{50} = Y - \frac{b}{a} \text{ or } \frac{b}{a} = \text{rapport molaire} = \frac{[\text{antioxydant}]}{[\text{DPPH}\bullet]}$$

Connaissant les rapports molaires d'*Hibiscus acetosella* y compris celui de la vitamine C, nous pouvons calculer les différentes concentrations inhibitrices (résultats obtenus au tableau 3) : Vitamine C = $0,5 - 0,45625 = 0,04375 \mu\text{g/mL}$; *Hibiscus acetosella* = $0,5 - 0,4 = 0,1 \mu\text{g/mL}$. Il se dégage de ces résultats que la vitamine C a une activité antioxydante plus élevée que celles des anthocyanes totaux d'*Hibiscus acetosella*. Ce fait s'explique facilement par le fait que la vitamine C utilisée est un composé pur alors que les anthocyanes sont des mélanges de plusieurs composés.

4. Conclusion

Cette étude qui se situe dans le cadre général de la recherche des pigments végétaux naturels pouvant servir, comme antioxydants avait pour objectif principal : d'extraire, les caractériser et les utiliser comme antioxydants naturels. Les principaux résultats obtenus ont été les suivants : L'évaluation des propriétés anti oxydantes a été menée grâce à la réaction de réduction du radical DPPH• qui est stable et présente un maximum d'absorption à 515 nm. Les anthocyanes totaux extraits d'*Hibiscus acetosella* ont présenté une EC₅₀ de 0,100 µg/mL alors que la vitamine C prise comme antioxydant témoin a présenté une EC₅₀ de 0,0437µg/mL. Il est donc important de signaler que les anthocyanes d'*Hibiscus acetosella* présente un potentiel pouvant conduire à leur utilisation comme source d'antioxydants et peuvent être utilisés contre certaines maladies causées par des stress oxydatifs divers. Toujours à titre comparatif, il paraît utile de signaler également les résultats obtenus par (G. Kamran and *al.*, 2009 :277-281) sur l'activité antioxydante des pelures de treize espèces de citruses. Ils avaient enregistré des EC₅₀ allant de 0,6 à 3,3µg/mL et avaient qualifiés ces activités d'importantes. Pourtant, celle que nous avons enregistrée dans le présent travail est nettement meilleur (0,100 µg/mL) ; tant que l'EC₅₀ est trop petit, l'activité antioxydante est élevée. En comparant nos résultats avec ceux enregistrés par (Khalaf and *al.*,2008 :51-55) , cette activité est nettement plus importante car ils ont trouvé les EC₅₀ dans l'ordre de 6,73 µg/mL pour le thé vert et 681,5 pour *Elettaria cardamomum* (L) et pourtant les anthocyanes totaux extraits d'*Hibiscus acetosella* ont présenté l'EC₅₀ de 0,100 µg/mL alors que la vitamine C prise comme antioxydant témoin a présenté une EC₅₀ de 0,04375µg/mL. Toutefois, il sera question en perspectives de tester pour chaque anthocyane isolé : ses propriétés anti oxydantes, d'autres activités biologiques de l'organisme.

REFERENCES

- [1] A. Joana, Iva F. and Faria A., , 2010. Antioxidant properties of anthocyanin's, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins Food Chemistry, vol.119 :518-523
- [2] A. NDUNGI (2019) , Étude de l'activité antioxydante des pigments polyphénologiques naturels : cas des anthocyanes des feuilles pourpres de *canna indica* Linn. Et d'*hibiscus acétoselle* when ex hiern; Thèse de Doctorat, Université de KISANGANI 156 pages
- [3] C. Koechlin -Ramonalxo, 2006. Oxygen oxidative stress and antioxidant supplementation or another way of nutrition in respiratory diseases Nutr. Clin. and Metab.20:165-177
- [4] Cheikh Beye, Lat Souk Tonkawa, Seck, Mamadou Amadou, Phylippe T. and Patrick, (2015) Biotech.Agron. Soc.Env. ,19 (4), 392- 401.
- [5] Cherifa BOUBEKRI,. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques (2014) ; Thèse de Doctorat, Université Mohamed Khider –Biska 210 Pages.
- [6] D. Habrant, Synthèse et caractérisation des nouveaux antioxydants aromatiques d'acides fulviques pour application en dermo-cosmétique : 187-191(2008) ; Thèse de Doctorat Strasbourg, Université Louis Pasteur, bases des données W.W.W. Thèse .fr depuis 1985 en France ,214p.
- [7] D. J Cram et Hammond G.S., Chimie organique, Presses Universitaires de Laval, Québec (2017) : ISBN-10 :2257151045, ISBN-13 :978-22 57151049.
- [8] G. Kamran, Joseph G., Mohamed R., tissues 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues (2009), Sci, vol 22 N° 3 pp 277-281
- [9] Giusti Mónica, M., & Wrolstad, R. E, 2005. Spectroscopy Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible In Handbook of Food Analytical Chemistry, Vol. 2–2, pp. 19–31
- [1] H. Sies,1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application; Am J. Med, 91, 31S-38S.
- [10] Heim K.E.and Bobilya D.J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships (2002), J. Nutr. Biochemist, 13, 572-584

- [11] I Raskin, 2002. New strategy for the search of natural biological active substances, Russian journal of plant physiology, volume 55, n°11183, 1608-3407,
- [12] Isorez, 2007. Contribution à la chimie de flavonoïdes : accès à des analogues du pigment du vin rouge, Thèse de Doctorat Université Louis Pasteur de Strasbourg, 228 P.15-20
- [13] J. Bruneton, Pharmacognosie : Phytochimie des plantes médicinales, (2009), 4e éd., Lavoisier, revue et augmentée ; Paris, Éditions médicales internationales, 1288 p. (423- 440)
- [14] J. Nermin et Brunel JF., Fascicules des travaux pratiques des matières médicales (1995), Université Nationale de Côte d'Ivoire, Faculté de Pharmacie, département de Pharmacognosie, laboratoire de phytologie 47p.
- [15] J. Pince mail, Defraigne O., 2003. Espèces oxygénées en médecine humaine : une approche didactique. Vaisseaux, Cœur, Poumon; 3:133-8
- [16] J.O., Defraigne, 2007. Article sur le stress oxydant et antioxydant, mythe et réalité ? Rev.Med Liège P.206
- [17] JB. Harborne, 1999. Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, New York: P 1-30,
- [18] Khalaf, Ashok.K, Shakya, 2008 . Antioxidant Activity of Some Common Plants Turk J Bio 32 51-55 © TÜBITAK, 55 pages
- [19] Koffi NGUSAM, Beugre KADIA, Guede N., Dossa hua T., and Laurent A., Screening Phytochimique de quelques plantes médicinales Ivoiriennes utilisées en pays Krobu (Agbo ville, Cote d'Ivoire) (2009). Sciences et Nature volume 6 N°1 :1-18.
- [20] Lawton et Barbara P., 2004. Hibiscus : les plantes vivaces et tropicales pour le jardin. Timber Press. p. 36. ISBN 978-88192-654-5 ;
- [21] M. Andersen & M. Jordheim, 2006. The anthocyanins. In: Andersen M. & Markham K.R., eds. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton, FL, USA : CRC Press. Plant Science, 150 pp. 72- 80
- [22] M. Giusti et R. E. Wrolstad, 2001. "Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy." New York: John Wiley & Sons: Unit. F1.2.1-13
- [1] M. M. Giusti, & Wrolstad, R. E. , 2003. Acylated anthocyanin's from edible sources and their applications in food systems Biochemical Engineering Journal, 14, 217-22.
- [23] N. Kovinich, Not all anthocyanins are born equal: distinct patterns induced by stress in Arabidopsis. Plantae, 240, 931-940; 2014.
- [24] R. Brouillard and J.M Kong , 2003. Analysis and biological activities of anthocyanin's, Photochemistry 64(5): 923- 933
- [25] R. Williams and Crayer, 2004. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? Free radbiomed. Plants for human nutrition 59 :113 -122,
- [26] R., Re Pellegrini N., Prottegente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolonization assay. Free radical Biology and Médecine, 26, 1231- 1237; 1999.
- [27] V.L. Singleton et Rossi J.A., 1965. Colorimetric of total Phenolic with phosphomolybdique-phosphotungstique Acid reagents (1965); Am. J. End.Virticol 16:144-158.
- [28] W. Blot, Li JY, Taylor P., 1993. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease -specific mortality in the general population." dans J. Natl Cancer Inst, vol, 85.p.1483-1491