

**TD : Techniques d'extraction, de Purification et activité antioxydante
des molécules d'intérêt**

Exercice 1 : Trois méthodes d'extraction ont été testées pour extraire les polyphénols à partir des écorces de grenade : macération (M), ultrasons (UAE), et Soxhlet (S). Les résultats suivants ont été obtenus pour les rendements d'extraction (% en poids sec) :

Méthode	Solvant	Température (°C)	Temps (h)	Rendement (%)
M	Éthanol 70%	25	24	4.5
UAE	Éthanol 70%	50	1	6.8
S	Éthanol 70%	65	6	5.9

Questions :

1. Analysez ces résultats en identifiant les avantages et inconvénients de chaque méthode en termes de rendement, durée, et température.
2. Si vous deviez conseiller une méthode à une industrie soucieuse d'économie d'énergie, laquelle choisiriez-vous ? Justifiez.

Correction EXO1

1. Analyse des résultats

- **Macération** : Rendement faible (4.5 %) mais méthode simple et peu coûteuse ; temps d'extraction très long.
- **UAE** : Meilleur rendement (6.8 %) en un temps réduit (1 h) ; efficace à température modérée (50 °C).
- **Soxhlet** : Rendement intermédiaire (5.9 %) mais nécessite une température élevée (65 °C) et une durée importante (6 h), ce qui augmente les coûts énergétiques et le risque de dégradation thermique.

2. Conseil à l'industrie

Méthode conseillée : UAE.

○ Justifications :

- Meilleur rendement énergétique : extraction rapide à basse température.
- Faible consommation de solvant.
- Idéal pour des entreprises soucieuses de durabilité et d'économies d'énergie.

Exercice 2 :

1. Vous avez extrait **5 g** d'un composé à partir de **50 g de matière sèche**. Calculez le rendement en pourcentage. Si on augmente la quantité de solvant, que se passe-t-il avec le rendement ? (Suppositions à formuler.)
2. Vous utilisez un solvant **aqueux à 80 %** pour extraire des polyphénols. Proposez des modifications (température, durée, nature du solvant) pour améliorer l'efficacité. Justifiez vos choix.

Corriger exo 2 :

1. Calcul de rendement :

- Masse extraite = 5 g, masse de matière sèche = 50 g.
Rendement (%) = $(\text{Masse extraite} / \text{Masse initiale}) \times 100 = (5/50) \times 100 = 10\%$.

Si on augmente la quantité de solvant :

- Le rendement peut augmenter initialement (meilleure diffusion), mais au-delà d'un certain seuil, le rendement reste constant (saturation).

2. Optimisation :

- Paramètres à modifier :
 - a) Augmenter la température (jusqu'à 50-60 °C pour éviter la dégradation).
 - b) Utiliser un solvant plus polaire (éthanol 70 % au lieu de 80 %).
 - c) Prolonger le temps d'extraction (exemple : de 30 min à 1 h).

Exercice 3

- 1. Conception d'un protocole HPLC :** On veut purifier des caroténoïdes à partir d'un extrait des écorces d'orange :
 - a) Choisissez une phase stationnaire adaptée.
 - b) Proposez un gradient de solvant (eau/éthanol ou acétonitrile).
 - c) Justifiez vos choix en fonction de la polarité des caroténoïdes.
- 2. Interprétation de chromatogrammes :** On a obtenu le chromatogramme suivant :
 - Pics à 2,3 min, 5,1 min et 9,4 min.
 - Seul le pic à 9,4 min correspond au composé d'intérêt. Proposez des ajustements aux conditions (gradient, débit) pour améliorer la résolution.

Corrigé exo 3 :

- 1. Conception d'un protocole HPLC :**
 - Phase stationnaire : Colonne C18 (phase inversée) adaptée aux caroténoïdes hydrophobes.
 - Gradient :
 - Début : 70 % eau / 30 % acétonitrile.
 - Fin : 10 % eau / 90 % acétonitrile (en 20 minutes).
 - Justification : Les caroténoïdes étant apolaires, un solvant non polaire comme l'acétonitrile est idéal pour améliorer leur élution.
- 2. Interprétation de chromatogrammes :**
 - Problème : Mauvaise résolution entre les pics.
 - Solutions :
 - a) Diminuer le débit de la phase mobile (exemple : 1 mL/min à 0,8 mL/min).
 - b) Ajuster le gradient (ralentir la montée en acétonitrile).
 - c) Tester une colonne à meilleure sélectivité (C30 au lieu de C18).

Exercice 4 :

1. Un extrait contient 3 molécules d'intérêt (A, B, C) avec les propriétés suivantes :
 - A : Masse molaire = 200 g/mol, polaire.
 - B : Masse molaire = 400 g/mol, légèrement polaire.
 - C : Masse molaire = 600 g/mol, apolaire.

- Proposez un protocole pour séparer ces composés en utilisant la chromatographie.
2. Vous travaillez sur l'extraction de polyphénols à partir de marc de raisin.
- Après extraction, proposez une méthode pour purifier les polyphénols en éliminant les sucres et autres impuretés.

Corrigé Exo 4 :

1. **Cas 1 :**

- Protocole :
 - a) Extraction par solvant (méthanol/eau).
 - b) Chromatographie sur colonne (silice) pour éliminer les composés polaires (A).
 - c) Chromatographie liquide (HPLC phase inversée) pour séparer B et C.
- Gradient : 50 % eau / 50 % acétonitrile initial, augmenté à 90 % acétonitrile en 10 min.

2. **Cas 2 :**

- Protocole de purification des polyphénols :
 - a) Extraction brute par solvant (éthanol/eau, 70:30).
 - b) Élimination des sucres par ultrafiltration (membrane 1 kDa).
 - c) Purification finale par chromatographie échangeuse d'ions.
- Défis industriels :
 - Temps : Processus multi-étapes ralentissant la production.
 - Coût : Solvants et membranes.
 - Écologie : Recyclage des solvants pour réduire l'impact environnemental.

Exercice 5:

On veut évaluer l'activité antioxydante d'un extrait végétal par la méthode DPPH.

1. Propose le protocole expérimental (étapes principales).
 2. Explique comment on calcule l'IC50.
 3. Si on obtient un % d'inhibition de 75 % à 100 µg/mL, est-ce un bon résultat ?

Corriger Exo 5

1. Protocole DPPH (simplifié) :

- Préparer la solution de DPPH (généralement 0,1 mM dans méthanol ou éthanol).
- Ajouter différentes concentrations de l'extrait à la solution de DPPH.
- Incuber 30 minutes à l'obscurité à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance à 517 nm.

2. Calcul de l'IC50 :

- % inhibition = $[(A \text{ témoin} - A \text{ échantillon}) / A \text{ témoin}] \times 100$.
- Tracer la courbe % inhibition vs. concentration.
- Déterminer la concentration correspondant à 50 % d'inhibition (IC50).

3. 75 % d'inhibition à 100 µg/mL indique une **bonne activité antioxydante**, surtout si l'IC50 est inférieur à 200 µg/mL (dépend du standard utilisé).

Exercice 6

Un extrait de pépins de raisin a montré une activité antioxydante de **80 % d'inhibition ABTS à 100 µg/mL**, tandis qu'un extrait de marc de café a montré **45 %** à la même concentration.

Q1. Lequel a une meilleure activité antioxydante ?

Q2. Propose une explication à cette différence.

Corrigé exo 6 :

R1. L'extrait de pépins de raisin.

R2. Plus grande richesse en polyphénols ou meilleure synergie entre composés actifs.

IC50 = concentration nécessaire pour inhiber 50 % du radical ABTS ; plus elle est faible, plus l'extrait est actif.

Exercice 7 :

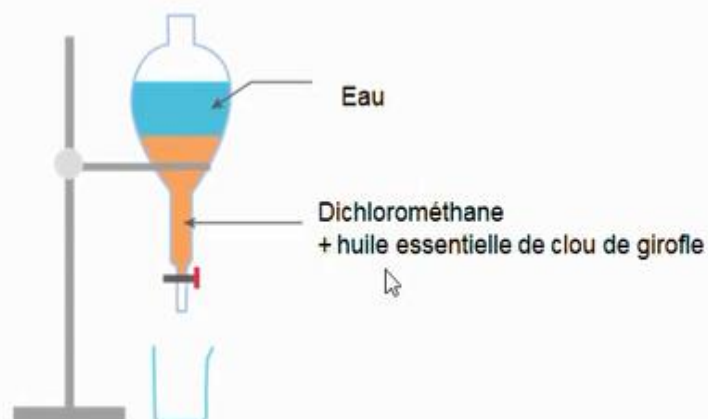
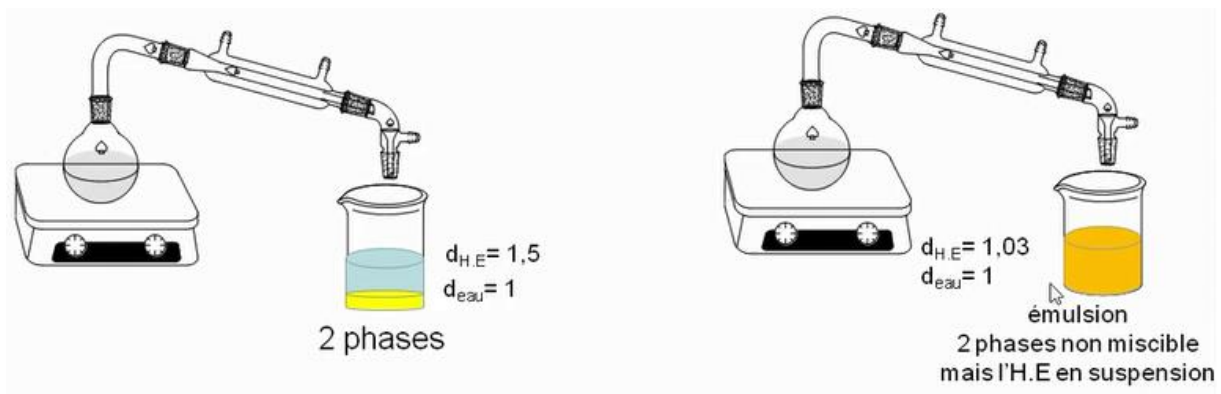
L'huile essentielle (H.E) de clou de girofle obtenu par hydrodistillation a une densité comprise entre 1,03 et 1,04. Pour obtenir une bonne extraction de l'huile essentielle, on ajoute du dichlorométhane.

Données : densité de l'eau $d_{\text{eau}} = 1$; densité du dichlorométhane $d_{\text{d}} = 1,34$

Solubilité de l'huile essentielle de clou de girofle : faible dans l'eau, grande dans le dichlorométhane

1. Pourquoi est-il difficile de séparer l'huile essentielle de la phase aqueuse après hydrodistillation ?
2. Expliquer en quoi l'ajout de dichlorométhane améliore la séparation de l'huile essentielle

Corrigé exo 7



Exercice 8 :

Complétez le tableau suivant en classant les antioxydants selon leur nature et origine :

Nom du composé	Origine (naturelle/synthétique)	Type (enzymatique/non-enzymatique)	Exemple d'aliment source
Superoxyde dismutase	?	?	?
BHT	?	?	?
Acide ascorbique	?	?	?
Quercétine	?	?	?
Glutathion	?	?	?

Nom du composé	Origine	Type	Exemple d'aliment source
Superoxyde dismutase	Naturelle	Enzymatique	Cellules animales et végétales
BHT	Synthétique	Non-enzymatique	Aucun (additif alimentaire)
Acide ascorbique	Naturelle	Non-enzymatique	Agrumes, kiwis, brocolis
Quercétine	Naturelle	Non-enzymatique	Oignons, pommes, raisins
Glutathion	Naturelle	Enzymatique	Foie, épinards, avocats

Rappel des principales techniques d'extraction

Méthode	Principe	Avantages	Inconvénients
Macération	Trempage dans un solvant à température ambiante	Simple, peu coûteux	Longue durée, rendement limité
Décoction	Ébullition dans l'eau ou un solvant	Extraction rapide des composés hydrosolubles	Dégradation thermique possible
Soxhlet	Extraction par reflux continu du solvant	Extraction exhaustive	Long, consommation de solvant
Ultrasons	Cavitation des bulles favorisant la rupture des cellules	Réduction du temps, augmentation rendement	Investissement matériel
Micro-ondes	Échauffement rapide par agitation des molécules polaires	Temps court, solvant réduit	Nécessite un équipement adapté
CO₂ supercritique	Utilisation de CO ₂ à haute pression/température	Solvant écologique, pas de résidu	Coût élevé, expertise technique