



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Effets d'un acide fort sur la réaction de la DPPH avec deux huiles essentielles de deux plantes aromatiques acclimatées au Togo

Kokou Agbékonyi AGBODAN*, Kokouvi DOTSE, Kossi Honoré KOUMAGLO et
K. Issa SALOUFOU

*Laboratoire des Extraits Végétaux et Arômes Naturels (LEVAN), Faculté des Sciences,
Université de Lomé, BP 1515, Togo.*

*Auteur correspondant ; E-mail : akatologo@yahoo.fr; Tél : (228)90047531

RESUME

Des études ont montré que les extraits de certaines plantes médicinales ainsi que leurs huiles essentielles (HE) sont sources de substances bioactives avec de potentiels antioxydants remarquables. L'objectif de ce travail est l'étude de l'influence du milieu réactionnel sur l'action des HE des plantes, de *O. basilicum* et *O. gratissimum* acclimatées au Togo, sur la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle. Les constituants chimiques des HE sont identifiés par la chromatographie en phase gazeuse. Le test de réduction de la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) et celui de réduction de l'ion ferreux Fe^{2+} (FRAP) sont utilisés pour déterminer la capacité antioxydante. Les propriétés antioxydantes des HE ont été mises en évidence par la recherche de l'intensité colorante (IC_{50}) et la détermination de l'équivalent en Fe^{2+} des solutions testées. L'introduction d'un acide fort (acide chlorhydrique) influence les paramètres cinétiques. Les huiles essentielles étudiées contiennent le thymol et l'eugénol et sont anti oxydants. Toutefois, en se référant à la classification de Sanchez-Moreno, ces huiles essentielles ont un pouvoir anti-radicalaire faible. Dans l'intervalle de concentrations étudié [0,025-0,1] M, la réaction est accélérée les cinq premières minutes avec un taux de conversion, comme la vitesse de réaction très élevés. Le mécanisme (*electron transfer – proton transfer*) est prédominant. L'augmentation de la concentration en HCl et le temps ont favorisé le mécanisme SPLET. Cette étude a montré que les huiles essentielles étudiées ont un pouvoir anti-radicalaire faible mais, elles ont des vitesses de réaction intermédiaires avec la DPPH.

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : *O. basilicum* et *O. gratissimum*, DPPH, antioxydant, facteurs cinétiques, huiles essentielles.

Effects of a strong acid on the reaction of DPPH with two essential oils from two aromatic plants acclimatized in Togo

ABSTRACT

Studies have shown that extracts of certain medicinal plants as their HE are sources of bioactive substances with potential remarkable antioxidants. The objective of this work is to study the influence of the reaction medium on the essential oils, *O. basilicum* and *O. gratissimum*, from Togo, their action on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. The chemical constituents of essential oils are identified using gas chromatography. The reduction tests with DPPH and reduction of Fe^{2+} ion (FRAP) are used to determine the antioxidant capacity.

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

2552-IJBSC

DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i6.32>

Antioxydant properties of the essential oils are shown up by the detection of colored intensity (IC_{50}) and by the determination of Fe^{2+} ion equivalent in the solutions. The addition of a strong acid (HCl) influences the kinetic parameters. The studied essential oils contain thymol and eugenol and are antioxidants. Although, based on the Sanchez-Moreno classification, these essential oils have weak antiradical activity. Within the studied concentration range from 0.025M to 0.1M, the reaction runs fast in the first five minutes as well as a high reaction speed. The mechanism (electron-proton transfer) is predominant. Increasing time and HCl concentration favored SPLET mechanism. This study showed that essential oils studied have low anti-radical power, but they have intermediate reaction rates with DPPH.

© 2015 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: *O. basilicum*, *O. gratissimum*, DPPH, antioxidant, kinetic factors, essential oils.

INTRODUCTION

Les extraits de plantes aromatiques, ayant dans leurs compositions chimiques des composés phénoliques, sont de très bons anti oxydants (Dabire et al., 2011 ; Agbodan et al., 2014). Le basilic salubre (*Ocimum gratissimum* L., Labiateae) est une plante largement utilisée au Togo en raison de ses multiples vertus culinaires et thérapeutiques (Aïdam et al., 2008). L'huile essentielle de *Ocimum basilicum* acclimatée au Togo a un potentiel antioxydant remarquable. Les caractéristiques du milieu réactionnel ont une grande influence sur le pouvoir antioxydant (Volkov, 2010). Afin de trouver les conditions d'une action synergique des HE de *Ocimum basilicum* et de *Ocimum gratissimum* avec d'autres composés, l'influence du milieu réactionnel sur la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est étudiée dans le présent travail. Cela permettrait de choisir les conditions optimales d'une action synergique avec d'autres extraits.

MATERIEL ET METHODES

Préparation de la solution acidifiée de méthanol

Dans une fiole jaugée de 100 ml, 20 ml de méthanol ont été ajoutés préalablement et 890 μ l d'acide chlorhydrique, prélevé à la micropipette, sont introduits. La fiole est ensuite remplie avec du méthanol jusqu'au trait de jauge. La solution ainsi préparée est une solution acidifiée de méthanol de concentration 0,1 M. Avec cette solution, des échantillons d'HE ont été préparés à la concentration correspondant à l' IC_{50} , soit 266

ppm pour *O. basilicum* et 875 ppm pour *O. gratissimum*. Pour 1 mg de *O. basilicum* (correspondant à peu près à une goutte), utiliser 3,8 ml de solution acidifiée et pour 1 mg d'*O. gratissimum*, 1, 15 ml. Les calculs ont donné les résultats inscrits dans le Tableau 1.

Détermination de l'activité antioxydante (AAO)

Les mesures ont été effectuées avec un spectromètre GENESYS 10S UV – VIS. Le pouvoir réducteur des HE est déterminé par la méthode de réduction des ions Fe^{2+} (Benzie et al. 1999) et le test à la 2,2-diphényl -1-picrylhydrazyle (DPPH) par la méthode décrite par Saar et al. (2015). Pour la détermination de l'intensité colorante IC_{50} , les titres des solutions testées se situent dans l'intervalle [0-1000 ppm]. Trois essais sont effectués pour chaque concentration donnée et la moyenne des densités optiques est déterminée. A partir des concentrations de l'huile essentielle de *O. gratissimum*, des densités optiques lues et des pourcentages d'inhibition calculés, l'intensité colorante IC_{50} est déterminée.

RESULTATS

L'analyse par GC et GC/MS de l'huile essentielle de *O. gratissimum* a permis d'identifier 34 composés représentant plus de 94,62% de l'huile essentielle brute (Tableau 2). Les composés majoritaires sont le Thymol (21,32%), -pinène (8,80%), Myrcène (4,75%), - terpinène (2,47%), - terpinène (7,73%), p-cymène (28,78%), Caryophyllène (3,32%), - sélénène (5,50%). Aïdam et al. (2008) au Laboratoire de Physiologie et de

Biotechnologie Végétale, de l'Université de Lomé, ont trouvé des résultats similaires : (thymol (26,79 à 30,17%), p-cymène (13,15 à 20,57%), γ -terpinène (12 à 19%), β -myrcène (6,97 à 7,88%) et le β -sélinène (4,11-8,02%). La petite différence proviendrait, entre autre, du stade considéré (stade végétatif ou de floraison). Le potentiel antioxydant (266 ppm) de l'HE de *Ocimum basilicum* a été déterminé antérieurement (Agbodan et al., 2014) et celui de *O. gratissimum*, déterminé dans les mêmes conditions, donne 875 ppm. L'IC₅₀ de la quercétine, molécule de référence, est égale à 20 ppm dans nos conditions d'expérience. L'équivalent en Fe²⁺ est de 515 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ pour l'HE de *O. gratissimum*. Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, le temps TEC₅₀ est déterminé et analysé. Le paramètre TEC₅₀, défini comme le temps atteint à l'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à IC₅₀, est déterminé graphiquement à partir de la Figure 1. A partir des deux facteurs IC₅₀ et TE₅₀, le paramètre d'efficacité anti-radicalaire est obtenu. Pour une bonne évaluation de l'activité antiradicalaire, il ne faut pas oublier que le pH a considérablement diminué quand on ajoute au milieu de l'acide chlorhydrique concentré. En effet, l'évaluation de l'activité antiradicalaire doit être interprétée avec

précaution du fait que l'absorbance de la solution de la DPPH* entre [515-520] nm diminue sous l'action de la lumière, de l'oxygène, en fonction du pH et le type du solvant additionné à l'anti oxydant (Popovici et al., 2006). Des précautions ont été prises dans ce sens. L'efficacité anti-radicalaire (EAR) est déterminée à l'aide de la relation suivante :

$$EAR = \frac{1}{IC_{50} \times TCE_{50}} \quad (\text{ml}/\mu\text{g} \times \text{mn})$$

Les paramètres cinétiques sont résumés dans le Tableau 3. Le thymol qui est le 6-isopropyl-2-méthylphénol et le 2-méthoxy-4-(prop-2-ényle)-phénol, l'eugénol sont des composés phénoliques qui ont, selon plusieurs auteurs, un potentiel antioxydant remarquable. Les huiles essentielles étudiées en comportent une proportion non négligeable dans leur composition chimique. Toutefois, en se référant à la classification de Masunda et al. (2014), il ressort que les huiles essentielles de *O. basilicum* et de *O. gratissimum* ont un pouvoir anti-radicalaire faible mais par rapport à la vitesse de réaction, elles ont des réactions intermédiaires avec la DPPH. (Brand-Williams et al., 1995 ; Scherer et al., 2009).

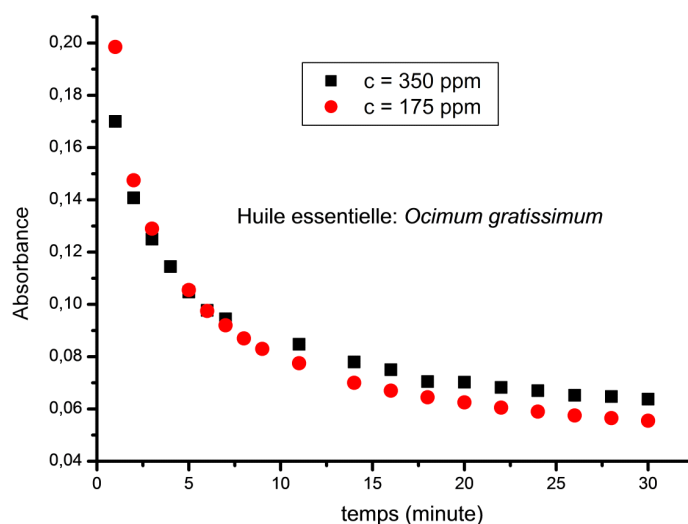


Figure 1 : Evolution de l'absorbance de l'HE de *O. gratissimum* en fonction de la concentration en AO et du temps de réaction.

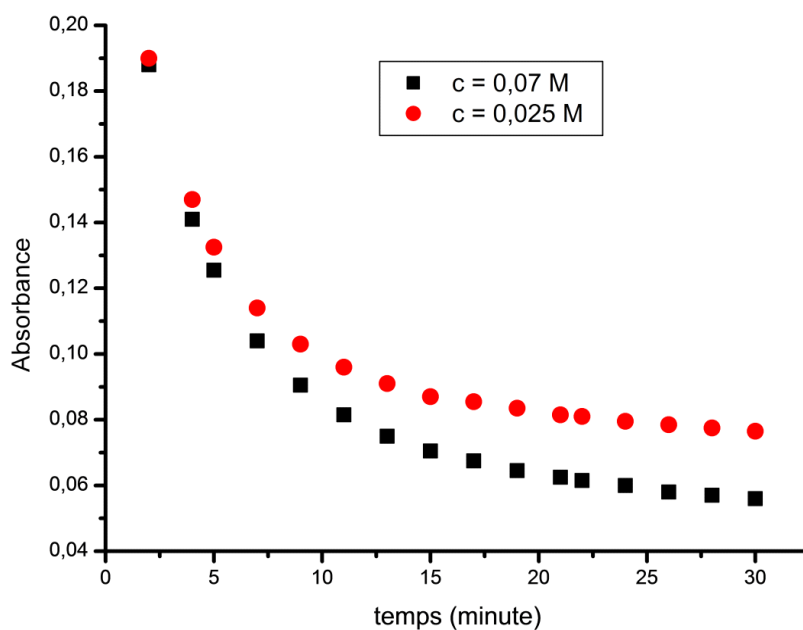


Figure 2 : Influence de la force de l'acide sur la vitesse de la réaction de la DPPH avec L'HE d'*O. gratissimum* en solution dans du méthanol acidifié.

Tableau 1: Données sur la préparation des solutions d'HE de *O. gratissimum* et de *O. basilicum*.

	Masse à vide	Avec l'HE	Masse de l'HE	Volume de l'acide
<i>O. gratissimum</i>	9,284 g	9,287 g	3 mg	11,4 ml
<i>O. basilicum</i>	11,520 g	11,522 g	2 mg	2,30 ml

Tableau 2: Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum*.

Composés	Teneurs (%)
-pinène	8,80
Camphène	0,20
-pinène	0,58
Sabinène	0,81
- 3-carotène	0,27
Myrcène	4,75
- phellandrène	0,27
- terpinène	2,47
Limonène	1,05
- phellandrène	0,44
Trans ocimène	0,37
- terpinène	7,73
p-cymène	28,78
Terpinolène	0,17
Déhydro-p-cymène	1,26
Trans hydrate de sabinène	1,21
-copaène	0,15
Aldéhyde benzoïque	0,03

Linalol	0,20
Cis hydrate de sabinène	0,35
Méthyltymol	0,40
Teroinen-1-ol-4	0,94
Caryophyllène	3,32
3-thuyen-2-one	0,26
- humulène	0,53
-terpinéol	0,25
Bornéol	0,42
Germacrène D	0,67
- sélinène	5,50
- cadinène	0,05
p-8-cyménol	0,32
Oxyde de caryoophyllène	0,55
Thymol	21,32
Carvacrol	0,20
Total (%)	94,62

Tableau 3. Paramètres cinétiques des réactions étudiées.

Echantillon (HE)	TCE ₅₀ (minute)	IC ₅₀ (ppm)	EAR (ml/µg x mn)	Caractéristique
<i>O. gratissimum</i>	30 minutes	875	$3,81.10^{-5}$	Faible, intermédiaire
<i>O. basillicum</i>	30 minutes	266	$1,25.10^{-4}$	Faible, intermédiaire

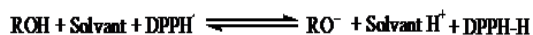
TCE₅₀ : Temps atteint à l'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à IC₅₀ ; EAR: Efficacité anti-radicalaire ; IC₅₀ : Intensité colorante.

DISCUSSION

La solution de DPPH est préparée avec du méthanol non acidifié car la décoloration est spontanée. Une plus grande concentration des réactifs en solution augmente la probabilité de réaction des deux espèces chimiques (DPPH et HE) et la vitesse de réaction est plus grande. Les courbes cinétiques de la Figure 1 montrent que les vitesses de la réaction n'augmentent plus après les cinq premières minutes. Les deux premières minutes, après le mélange de la solution de DPPH avec la solution de *Ocimum gratissimum*, la vitesse de la réaction est tellement élevée que l'absorbance a diminué considérablement, de 0,6 à 0,12. Les vitesses initiales ne dépendent pratiquement pas de la concentration en anti oxydant (AO). Vers la septième minute, la vitesse de réaction

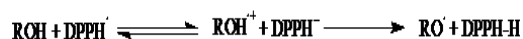
diminue pour la solution de concentration élevée (350 ppm) en antioxydant. Les attractions interatomiques et intermoléculaires influencent la constante diélectrique qui est une mesure du solvant qui renseigne sur l'état de solubilité et de dissociation des éléments le composant. Ainsi, un solvant avec une forte constante diélectrique encourage une importante dissociation des électrolytes (Akin, 2008). Une concentration élevée en AO augmente la constante diélectrique du milieu, (les particules chargées comme les ions hydronium, sont plus nombreux) et ne favorise pas l'action de l'antioxydant ROH. Des réactions de décomposition et d'interaction induisant un effet pro-oxydant (antagoniste) à celui du piégeage des radicaux libres d'autre part peuvent être à la base de ce constat. Dans un milieu acide fort, il y a

nivellement des autres composés donneurs de protons présents dans l'échantillon. L'HE de *O. gratissimum* ne devrait plus influencer la cinétique de la réaction. L'effet contraire a été noté. L'HE de *O. gratissimum*, est ainsi considérée comme un fort donneur de protons et donc un bon AO. Cela est dû aux composés phénoliques qui se trouvent dans sa composition chimique. Au niveau microscopique, la polarisabilité électrique des molécules ou atomes constituant le milieu influence la constante diélectrique. Dans le cas du mécanisme ET – PT (electron transfer–proton transfer) le passage d'une espèce apolaire à une autre espèce chargée, polaire (grande constante diélectrique), facilite et stabilise les paires ioniques formées. Ceci conduit à la réaction de formation de la DPPHH. La vitesse de la réaction avec le radical DPPH[•] augmente. Quand le mécanisme HAT (hydrogen atom transfer) se passe, une plus grande concentration du milieu en acide a le même effet sur la cinétique car la réaction est déplacée vers la formation des produits (RO[•], DPPHH). De plus, le pH du milieu joue comme un catalyseur. A 0,07 M, la formation de la DPPH₂ est plus accentuée que pour une concentration inférieure. L'augmentation de la concentration en H⁺ (provenant de l'AO), vers la septième minute, pour des concentrations différentes en AO, a conduit à un changement radical du sens de la réaction vers la formation de ROH. Dans l'équation fictive :



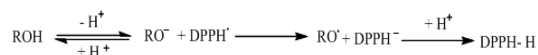
La formation de la DPPHH n'est plus favorisée, ce qui semble contredire les conclusions de Masunda selon laquelle, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant favoriserait plus la réduction du radical DPPH. Dans la présente étude la composition du milieu jouerait un rôle capital, et ROH est partiellement ou totalement

déprotonné. Ce résultat peut s'expliquer par le changement du mécanisme de la réaction.



La séparation des paires d'ions suivant ce mécanisme est favorable.

L'effet contraire est observé après 7 minutes et on observe le mécanisme SPLET dans la solution de plus grande concentration en AO.



L'augmentation de la concentration en acide n'a pas favorisé le mécanisme ET – PT. Cela confirme l'apport non négligeable du mécanisme SPLET. Après 30 minutes, la réaction est terminée. L'estimation de l'efficacité antiradicalaire (EAR) permet d'introduire la classification suivante. L'activité antiradicalaire est faible pour EAR < 1.10⁻³, intermédiaire entre [1.10⁻³-5.10⁻³], élevée entre [5.10⁻³,10.10⁻³], et très élevée pour EAR > 10.10⁻³. L'estimation de TCE₅₀ permet aussi d'introduire la classification suivante: TCE₅₀ < 5 min (réaction rapide), [5 - 30 min] (réaction intermédiaire) et TCE₅₀ > 30 min (réaction lente) (Sanchez-Moreno, 1998). Les résultats de l'efficacité anti-radicalaire trouvés, 3,81.10⁻⁵ et 1,25.10⁻⁴, respectivement pour *O. gratissimum* et *O. basillicum*, montrent que l'activité antiradicalaire est faible. Le TCE₅₀ de 30 min signifie que ces réactions sont classées intermédiaires.

Conclusion

L'introduction d'un acide fort dans le milieu réactionnel nivelle l'action des autres acides (avec de différents pKa) qui peuvent se trouver dans la composition chimique de l'huile essentielle. Cette introduction influence la vitesse de la réaction qui est d'habitude très grande dans les solvants organiques. Le ralentissement de la réaction

permet une étude cinétique qui rend compte de toutes les étapes de la réaction et des résultats clairs sont trouvés. L'étude permet de mieux choisir l'intervalle à considérer pour la détermination exacte de l'intensité colorante IC₅₀. Ainsi il est plus facile de trouver l'intervalle dans lequel la courbe présente une droite dont l'équation peut aider à trouver l'IC₅₀. L'introduction d'un acide fort dans le milieu réactionnel influence la cinétique de la réaction. L'augmentation de la vitesse de la réaction montre que le mécanisme ET – PT (electron transfer – proton transfer) est prédominant dans les cinq premières minutes par rapport au transfert de protons. Avec une concentration de 0,025 M comme avec celle de 0,07 M, l'allure de la courbe dans les cinq premières minutes, ne change pas. En se référant à la classification de Sanchez-Moreno, il ressort que les huiles essentielles de *O. basilicum* et de *O. gratissimum* ont un pouvoir antiradicalaire faible mais par rapport à la vitesse de réaction, elles ont des réactions intermédiaires avec la DPPH.

CONFLIT D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent qu'ils n'ont aucun conflit d'intérêts.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

L'auteur KAA est l'intégrateur principal et a participé à toutes les étapes des manipulations ; KD a participé à l'extraction des huiles essentielles et à la détermination des structures ; KHK a analysé les données et a participé à la préparation du manuscrit ; KIS a participé à toutes les étapes des manipulations; ainsi qu'à la recherche bibliographique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Laboratoire de Physiologie et de Pharmacologie de l'Université de Lomé, pour

tous les efforts de coopération consentis dans la réalisation de cette étude.

REFERENCES

- Agbodan KA, Dotse K, Koumaglo KH. 2014. Activités anti oxydantes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques acclimatées au Togo. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **8**(3): 1103-1110. DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v8i3.23>
- Aïdam A, Etse KD, Koba K. 2008. Capacités morphogénétiques in vitro, performance au champ et production d'huiles essentielles chez *Ocimum gratissimum*. *Acta. Botanica. Gallica.*, **155**(3): 341-354. DOI: 10.1080/12538078.2008.10516115.
- Akin MH. 2008. Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins : modélisation et interprétation métabolique. Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse , Toulouse, p. 66.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1999. Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.*, **299**: 15-27.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **28** : 25-30. www.researchgate.net/.../223633796
- Dabire C, Nèbie RHC, Belanger A, Nacro M, Sib SF. 2011. Effet du séchage de la matière végétale sur la composition chimique de l'huile essentielle et l'activité antioxydante d'extraits de *Ocimum basilicum* L. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **5**(3): 1082-1095. DOI : 1082-1095, 2011. 1083

- Masunda TA, Mbala MB, Kayembe SJ, LONGOMA BF, Ngbolua KN, Tshibangu DST, Mpiana PT. 2014. Activité anti-hyperglycémique et anti-radicalaire des extraits des fruits de *Raphia gentiliana* De Wild (Arecaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **8**(6): 2441-2451. DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v8i6.7>
- Popovici I, Saykova I, Tylkowsky B. 2006. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, **4**: 25-39. [info/docannexe.php?id=1061](http://info.docannexe.php?id=1061).
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **76**(2): 270-276. onlinelibrary.wiley.com.
- Sarr SO, Fall AD, Gueye R, Diop A, Diatta K, Diop N, Ndiaye B, Diop YM. 2015. Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **9**(3): 1263-1269. DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v9i3.11>
- Scherer R, Godoy HT. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Method Food Chemistry*, **112**: 654-658. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.026; URL
- Volkov VA. 2010. Caractéristiques physico-chimiques de la réaction de la 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl avec des antioxydants provenant des plantes. Thèse de doctorat, Université d'Etat de Tverse. Russie.