



Original Paper

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

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

Etude des propriétés fluorescentes d'un naphthopyranone isolé de *Guiera senegalensis*

Bédié MBOW¹, Diène Diégane THIARE², Ibrahima NDIAYE^{1*} et Atanasse COLY²

¹Groupe de Recherches sur les Substances Bioactives, (GRSB), Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.

²Laboratoire de Photochimie et d'Analyse, (LPA), Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.

*Auteur correspondant ; E-mail : ibraye@yahoo.fr ; Tel: (+221) 776425962.

RESUME

Guiera senegalensis est une plante très utilisée sur le plan thérapeutique au Sénégal et dans plusieurs pays de l'Afrique de l'Ouest. Ceci justifie le développement de méthodes d'analyse photochimiques du naphthopyranone fluorescent isolé de cette plante. Ainsi, ces types de composés pourraient être analysés à partir de liquides biologiques et faciliter l'étude pharmacologique. L'influence du pH en milieu aqueux et de plusieurs solvants organiques de polarité différente sur l'intensité de fluorescence et sur les spectres d'excitation et d'émission du naphthopyranone a été étudiée. Cette étude a permis de tracer les droites d'étalonnage du naphthopyranone, ce qui conduit à une droite de calibration fortement corrélée. Tous les paramètres analytiques qui en découlent ont été ainsi calculés. Les résultats de l'irradiation ont permis de déterminer la constante de la vitesse ($k = 4,85 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$), le temps de demi-vie ($t_{1/2} = 14,3 \text{ min}$), et la cinétique de photodégradation d'ordre 1. Les faibles valeurs de la limite de détection ($LD = 27 \text{ } \mu\text{g/mL}$) et celle de quantification ($LQ = 250 \text{ } \mu\text{g/mL}$) indiquent une bonne sensibilité de cette méthode d'analyse et son application éventuelle comme technique de détection qualitative et quantitative de ces types de composés dans l'urine ou le sang.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Naphthopyranone, *Guiera senegalensis*, analyse par fluorescence, lumière UV.

Study of the Fluorescent properties of a naphthopyranone isolated from *Guiera senegalensis*

ABSTRACT

Guiera senegalensis is a plant used in therapeutic in Senegal and in several countries of West Africa. This justifies the development of photochemical methods of analysis of the isolated fluorescent naphthopyranone of this plant. Thus, these types of compounds could be analyzed from biological fluids and facilitate the pharmacological study. The influence of pH and several solvents of different polarity on the fluorescence intensity, the excitation and emission of naphthopyranone spectra were studied. This study allowed to draw calibration lines of the naphthopyranone, which leads to a calibration line strongly correlated. All analytical parameters that result were calculated. The results of irradiation were used to determine rate constant ($k = 4,85 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$), half-life ($t_{1/2} = 14,3 \text{ min}$), and order 1 of the kinetic of photodegradation. The low values of the limit of detection ($LOD = 27 \text{ } \mu\text{g/mL}$) and quantification ($LOQ = 250 \text{ } \mu\text{g/mL}$) shows a good sensitivity of this method of analysis and its possible application as a technique for qualitative and quantitative detection of these types of compounds in urine or blood.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: Naphthopyranone, *Guiera Senegalensis*, analysis by fluorescence, UV light.

INTRODUCTION

Le *Guiera senegalensis* est une plante appartenant à la famille des combrétacées. C'est un arbuste de 2 à 3 mètres de hauteur présent en Afrique de l'Ouest et dans toutes les régions du Sénégal. Les études chimiques, pharmacologiques et toxicologiques déjà faites sur le *Guiera senegalensis* ont montré son importance sur le plan physiologique et son intérêt en thérapeutique (Silva et al., 2003 ; Silva, 2004; Silva et al., 2008; Zerbo et al., 2007).

A partir de cette plante, plusieurs métabolites secondaires ont été isolés et identifiés (Silva et al., 2003). Cependant, aucune de ces molécules n'a fait l'objet d'études spectrofluorimétriques approfondies. Etant donné que le *Guiera senegalensis* est une plante très utilisée sur le plan thérapeutique au Sénégal, une étude des propriétés fluorescentes des métabolites secondaires présents dans cette plante, en vue d'éventuelles études pharmacologiques a été initiée. En effet, la fluorescence est un puissant outil d'investigation des propriétés et d'analyse tant qualitative que quantitative des molécules organiques (Mbow et al., 2014). Sa précision et sa sensibilité ne sont plus à démontrer (Thiaré et al., 2014; Thiaré et al., 2015a; Coly, 2001; Coly et al., 2001; Coly et al., 2009). Cette étude s'intègre donc dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales Sénégalaises.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Les mesures de fluorescence à température ambiante ont été faites avec un spectrophotofluorimètre Kontron, modèle SFM-25 connecté à un ordinateur et piloté par le logiciel LCWIN-25.

Une lampe à haute pression de mercure, Osram 200W HBO avec une source d'alimentation Oriol modèle 8500 a été utilisée pour la réalisation des réactions de photolyse. Le dispositif photochimique inclut une lampe au mercure, un ventilateur et une lentille de quartz appropriée pour concentrer la radiation incidente sur la cuve contenant la solution. Une cuve parallélépipédique en quartz (Labo Moderne, France) comprenant cinq faces polies avec une épaisseur de 1 cm a été placée devant le faisceau optique à 60 cm de la lampe d'irradiation. Les mesures de pH ont été effectuées avec un pH-mètre Consort, modèle P107 et des micropipettes (Pipetman) de 20 et 100 µL ont été utilisées pour les dilutions.

Méthodes

Méthode d'extraction du naphtopyranone

La molécule présentée sur la Figure 1 est un naphtopyranone triméthoxylé, isolé et identifié dans le cadre de ce travail à partir d'une collection de *Guiera senegalensis* récolté à Taïba Ndiaye (Sénégal). Elle a été isolée après macération de 233 g de matière végétale sèche dans le chloroforme suivie d'une extraction liquide-liquide dans l'acétate d'éthyle. Après évaporation du solvant, 1,70 g de résidu ont été récupérés et soumis à une chromatographie sur colonne de silice (Si 60) avec gradient d'élution (Hexane/Acétate d'éthyle puis Acétate d'éthyle/Méthanol). Ainsi, 170 mg de naphtopyranone pur ont été isolés. Après isolement, l'analyse des spectres de RMN du proton et de masse ont permis de déterminer la structure du naphtopyranone qui a été confirmée par comparaison avec les données spectroscopiques de la littérature (Silva et al., 2003).

Toutes les solutions ont été préparées à partir de l'échantillon naturel de naphtopyranone.

Réactifs

L'acide chlorhydrique (36%), les pastilles d'hydroxyde de sodium (97%) et les solvants pour analyses spectroscopiques tels que l'acétonitrile (99,9% ; Trans. (230 nm : 99%), le butanol (99,7% ; Trans. (280 nm : 98%), le DMF (99,8% ; Abs. (340-400 nm) : 0,01) et le cyclohexane (99,5%; Trans. (255 nm : 98%) proviennent de Sigma Aldrich (Taufkirchen, Allemagne). Le méthanol (99,8% pour analyse fluorimétrique) vient de Carlo Erba.

Préparation des solutions

Une solution mère 10^{-3} M de ce composé a été préparée dans l'eau et des dilutions en série ont été effectuées pour obtenir les solutions standard de travail. Toutes les solutions ont été protégées contre la lumière avec une feuille d'aluminium et conservées au réfrigérateur à 6 °C. Les solutions mères de HCl (1N) et NaOH (1N) ont été préparées avec de l'eau distillée et les séries de dilutions ont été faites à partir de la solution mère.

Mesures analytiques et réactions de photolyse

Les propriétés spectrales du naphthopyranone dans les solvants organiques et en milieu aqueux à différents pH ont été étudiées et les conditions d'analyse optimisées. D'autre part, la cinétique de réaction de photolyse par voie fluorimétrique du naphthopyranone dans le méthanol a été étudiée et une méthode d'analyse pour la détermination directe du naphthopyranone dans un liquide biologique développé. L'intensité de fluorescence a été étudiée dans différents solvants de polarité différente comme le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, l'acétonitrile, le diméthylsulfoxyde et l'eau avec des pH variant de 2 à 12.

Pour étudier la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH de la solution, des concentrations appropriées de solutions d'acide chlorhydrique ou de soude ont été utilisées pour faire varier le pH. Un échantillon de la solution diluée du naphthopyranone a été placé dans la cuve en quartz et les spectres de fluorescence ont été enregistrés entre 200 et 300 nm pour l'excitation et entre 350 et 500 nm pour l'émission avec une vitesse de balayage de 480 nm/min. L'intensité de fluorescence a été déterminée à des longueurs d'onde maximales d'excitation (λ_{ex}) et d'émission (λ_{em}) fixes en mesurant la hauteur du pic spectral. Les courbes de calibration linéaires ont été obtenues à ces valeurs de λ_{ex} et λ_{em} . Les réactions de photolyse ont été effectuées en irradiant la solution placée dans la cuve avec la lampe pendant un temps donné, et à des intervalles de 5 min. L'influence de la photolyse UV a été suivie par l'enregistrement des courbes d'intensité de fluorescence (I_F) en fonction du temps d'irradiation UV (t_{irr}). Toutes les études de photolyse ont été réalisées à 22 °C. Aucun dispositif de refroidissement n'était nécessaire car il n'ya pas eu de chaleur produite pendant l'irradiation. Toutes les mesures de fluorescence ont été corrigées en tenant compte du signal du solvant et réalisées dans les mêmes conditions de voltage (HV = 400V) et de sensibilité (facteur = 1). Les données expérimentales ont été traitées avec un logiciel spécialisé : Microcal Origin, version 6.0, qui permet également de tracer les courbes. Au cours de la photolyse, la solution de la cuve de quartz était agitée magnétiquement.

RESULTATS

Les propriétés spectrales de fluorescence du naphthopyranone ont été étudiées dans différents solvants organiques protiques et aprotiques de polarités différentes et dans l'eau avec des conditions optimales de pH.

La cinétique de la réaction de photolyse du naphopyranone a été étudiée dans le méthanol et une méthode d'analyse quantitative valable pour la détermination directe naphopyranone dans un liquide biologique mis au point.

Le solvant d'analyse, le pH de la solution, la structure et la concentration du soluté ont des effets non négligeables sur le signal de fluorescence. Ainsi avant toute étude analytique, l'examen de l'influence de tous ces facteurs dans le milieu analytique a été nécessaire (Coly, 2001).

Effet du pH sur l'intensité de fluorescence du naphopyranone

L'influence du pH sur l'intensité de fluorescence du naphopyranone a été étudiée. La mesure du signal de fluorescence pour différentes valeurs de pH a conduit à la Figure 2 présentant l'effet du pH sur l'intensité de fluorescence du naphopyranone. Comme le montre la Figure 2, l'intensité de fluorescence est grande pour des valeurs de $\text{pH} \geq 8$ avec un signal qui est pratiquement constant sur une large gamme de pH comprise entre 8 et 12. Le pH optimal de 10 a été choisi pour la suite des expériences analytiques.

Effet de solvant sur l'intensité et sur les spectres de fluorescence

L'effet de solvant sur les propriétés spectrales du naphopyranone (λ_{ex} , λ_{em} , intensité de fluorescence) a été étudié dans plusieurs solvants organiques de polarités différentes. Les spectres d'excitation et d'émission obtenus sont bien résolus avec des pics apparaissant respectivement à 273 nm et 417 nm. L'allure et la forme de ces spectres sont les mêmes dans tous les solvants organiques étudiés (Figure 3) (Tableau 1) et il n'y a pas de déplacement significatif des longueurs d'onde analytiques d'excitation (λ_{ex}) et d'émission (λ_{em}).

L'intensité de fluorescence normalisée par rapport au THF varie de manière significative avec la polarité du solvant. A l'exception du DMSO, la polarité du solvant a favorisé l'émission de fluorescence de ce composé. Le signal de fluorescence est faible dans les solvants apolaires (THF et cyclohexane), plus élevé dans les solvants polaires protiques (butanol, ethanol et méthanol) et dans l'acétonitrile qui est polaire aprotique (Figure 4) (Tableau 1). Donc le méthanol est le milieu idéal pour l'étude des propriétés fluorimétriques du naphopyranone.

Lois cinétiques et constante de vitesse de la photolyse du naphopyranone

Dans cette partie, l'influence des rayons UV sur le signal de fluorescence d'une solution 10^{-6} M du naphopyranone a été étudiée. Cette étude a permis d'évaluer la stabilité de cette molécule vis-à-vis du rayonnement. L'influence de la lumière UV sur le signal de fluorescence a été suivie aux longueurs d'onde analytiques d'excitation et d'émission dans le méthanol ($\lambda_{\text{ex}} = 273$ nm ; $\lambda_{\text{em}} = 417$ nm). La Figure 5 ci-dessous montre que le signal de fluorescence diminue progressivement avec le temps d'irradiation jusqu'à une extinction totale au bout de 50 min d'irradiation. Ce résultat démontre que le naphopyranone est très sensible à la lumière et obéit à une cinétique de photodégradation du premier ordre dans le méthanol. En effet, la relation $\ln I_0 / I = kt$ est la seule équation trouvée valide (Figure 6) avec un coefficient de corrélation $r^2 = 0,990$. I_0 et I étant respectivement, l'intensité de fluorescence à $t = 0$ et $t > 0$. La constante de la vitesse de réaction ($k = 4,85 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) et le temps de demi-vie correspondant ($t_{1/2} = 14,3$ min) ont été calculés.

Paramètres de la détermination analytique du naphopyranone

Afin de sélectionner les conditions analytiques les plus intéressantes,

la méthode spectrofluorimétrique d'analyse du naphtopyranone a été optimisée en comparant les valeurs d'intensité de fluorescence dans les différents milieux étudiés.

A cet effet, nous avons établi la droite d'étalonnage du naphtopyranone dans le méthanol. Une droite de calibration linéaire a été obtenue (Figure 7) à partir de laquelle les

limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été évaluées conformément à la définition de l'IUPAC.

La Figure 7 montre que les points expérimentaux du tracé log-log sont bien alignés comme l'atteste le coefficient de corrélation ($r^2 = 0,997$). La méthode analytique développée a permis d'avoir une LD de 27 $\mu\text{g/mL}$ et une LQ de 250 $\mu\text{g/mL}$.

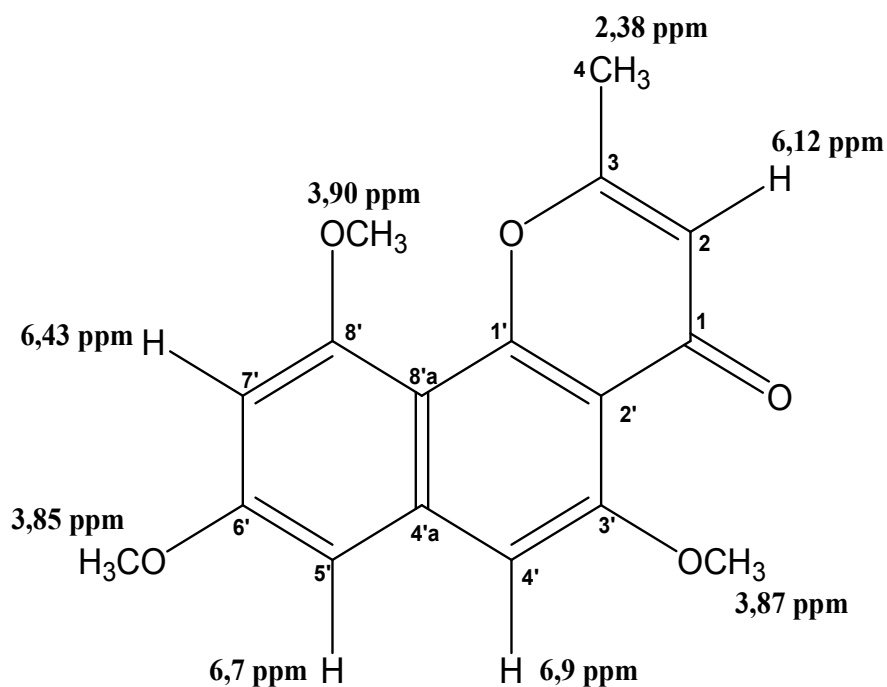


Figure 1 : Structure du naphtopyranone.

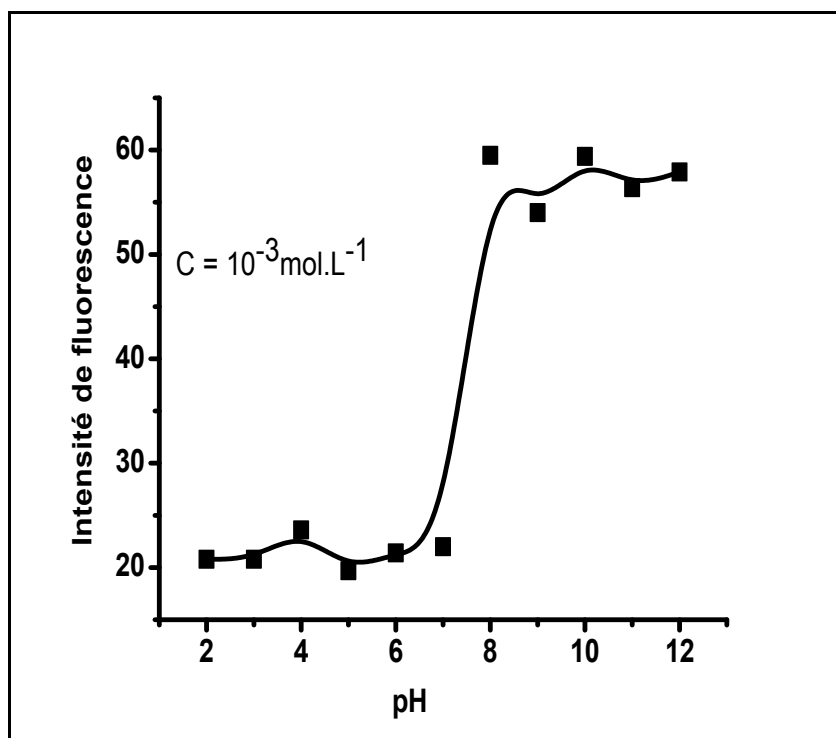


Figure 2: Effet du pH sur l'intensité de fluorescence du naphthopyranone.

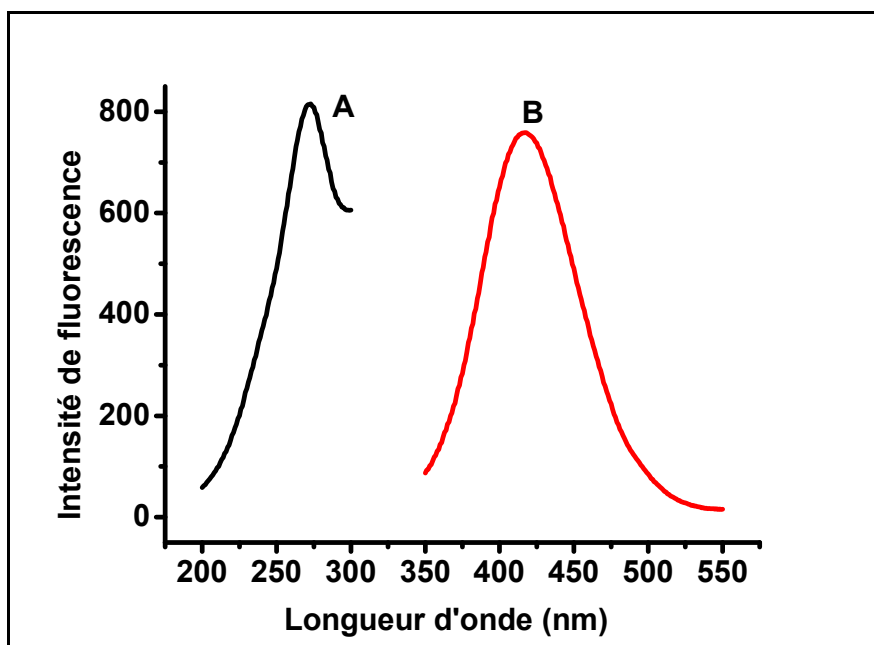


Figure 3: Spectre d'excitation (A) et d'émission (B) du naphthopyranone (10^{-3} M) dans l'eau, $\lambda_{\text{ex}} = 273 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 417 \text{ nm}$.

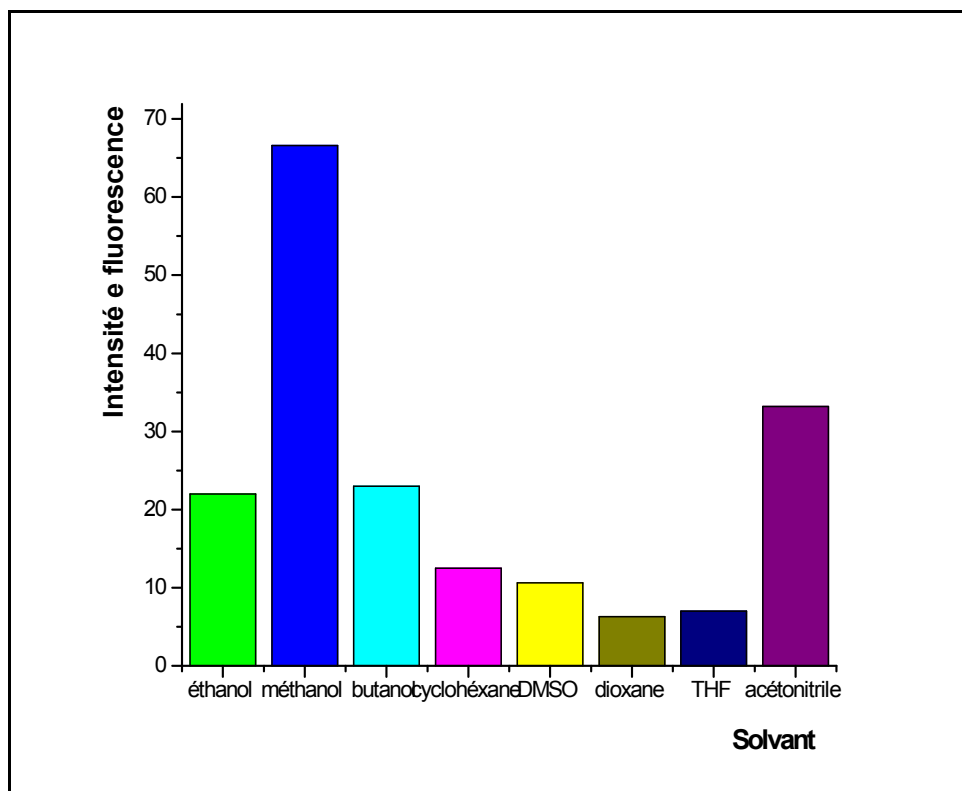


Figure 4 : Histogramme représentant l'effet du solvant sur le signal de fluorescence du naphthopyranone.

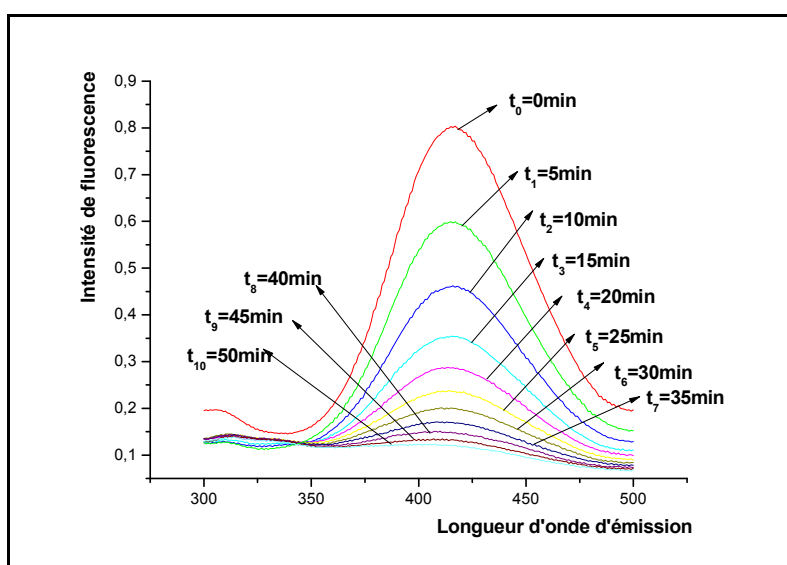


Figure 5 : Effet de l'irradiation UV sur les spectres d'émission du naphthopyranone (10^{-6}M) dans le méthanol : $\lambda_{\text{ex}}=273\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=417\text{ nm}$.

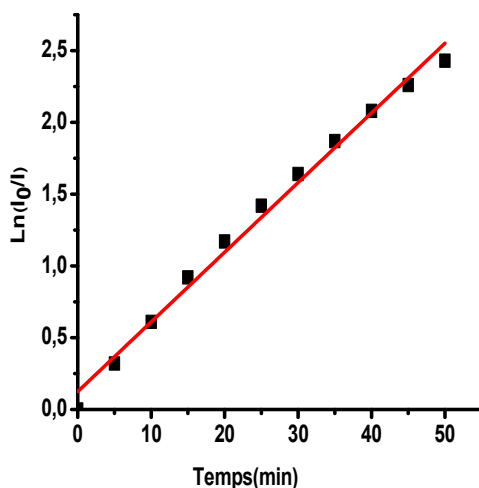


Figure 6: Courbe de la cinétique de photodégradation du naphthopyranone (10^{-6} M) dans le méthanol.

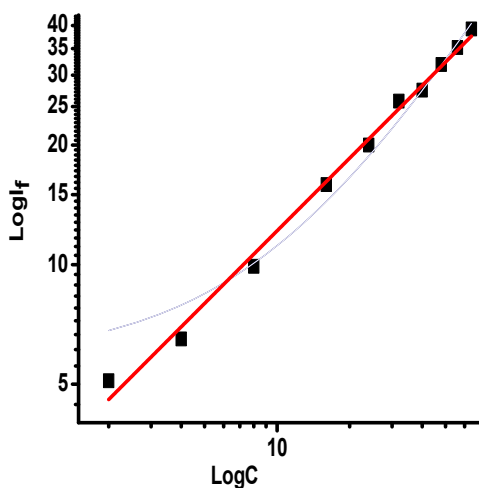


Figure 7: Courbe de calibration du naphthopyranone dans le méthanol.

Tableau 1: Variation de la fluorescence en fonction du solvant.

Solvant	$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ (nm) ^a	ϵ ^b	I_F ^c
Tétrahydrofurane	273/417	1,7	1,0
Cyclohexane	273/417	2.1	1,8
Butanol	273/417	17,5	3,3
Ethanol	273/417	24	3,1
Méthanol	273/417	33	9,5
Acetonitrile	273/417	37	4,7
Diméthylsulfoxyde	273/417	47	1,5

^aLongueurs d'onde d'excitation et d'émission (nm)

^bConstantes diélectrique

^c Intensité de fluorescence normalisée à partir de THF.

DISCUSSION

Plusieurs études ont montré que le pH est un facteur qui affecte fortement le signal de fluorescence des molécules organiques (Thiaré et al., 2014; Thiaré et al., 2015a; Coly et al., 2001; Coly et al., 2009). Pour le naphthopyranone, l'intensité de fluorescence augmente fortement à partir du pH 8 puis le signal devient constant entre 8 et 12. Le pH 10 a donc été choisi comme valeur optimale pour faire les mesures avec fiabilité. L'intensité de fluorescence dans ce milieu, n'a montré aucune différence par rapport à celle obtenue dans la zone de pH 8-12. Aucun déplacement significatif de la longueur d'onde d'excitation et d'émission n'apparaît avec le changement du pH.

Après examen de l'effet du solvant sur le signal de fluorescence du naphthopyranone (Figure 4) (Tableau 1), on remarque une forte variation selon le solvant. La forme des spectres d'excitation et d'émission était pratiquement similaire dans tous les milieux, avec une bande assez large. La longueur d'onde maximale d'excitation a été observée à 273 nm alors que pour l'émission, la bande se trouve à 417 nm pour tous les solvants (Tableau 1). Par conséquent, en tenant compte des changements importants de la polarité du solvant, on peut considérer que les λ_{em} ne changent pas avec la polarité du solvant. La valeur normalisée de l'intensité de fluorescence augmente d'une manière significative avec la polarité et la polarisabilité des solvants excepté le DMSO (Tableau 1). L'effet du solvant a montré que le naphthopyranone présente un important signal de fluorescence dans le méthanol qui pourrait s'expliquer par des interactions de moyenne intensité avec le soluté (Thiaré et al., 2015b). La faible intensité de fluorescence observée dans le diméthylsulfoxyde peut s'expliquer par de fortes interactions solvant-soluté (Thiaré et al., 2015b).

L'étude de l'influence des solvants de polarité très différente a abouti au choix du méthanol qui est le solvant approprié pour la photodégradation car présentant l'intensité de fluorescence la plus élevée. On observe une photodégradation rapide qui indique que cette famille de molécules est très sensible à la

lumière et ne devrait pas être exposée pendant de long moment au rayonnement solaire.

Les faibles valeurs de la limite de détection, de quantification et la forte corrélation de la droite d'étalonnage, indiquent que cette méthode d'analyse est précise et sensible. La fluorescence apparaît comme un outil efficace pour évaluer le degré de dégradation de ces types de composés à partir des échantillons biologiques comme le sang et l'urine.

Conclusion

Nous avons mis au point dans ce travail une méthode d'analyse du naphthopyranone qui est l'une des biomolécules de *Guiera senegalensis* par la méthode fluorimétrique. L'optimisation des paramètres analytiques a permis de trouver les limites de détection et de quantification qui sont relativement faibles. Enfin, l'irradiation du composé avec un rayonnement UV montre qu'il se décompose rapidement en raison du temps de demi-réaction de 14,3 min, relativement court. La méthode développée pourrait permettre de doser les substances fluorescentes issues de *Guiera senegalensis* dans les liquides biologiques tels que l'urine ou le sang. Cette méthode serait appropriée dans l'étude pharmacologique de substances bioactives et fluorescentes de cette plante médicinale largement utilisée en Afrique de l'Ouest.

CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs déclarent qu'il n'y a aucun conflit d'intérêts.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

BM a contribué à l'extraction, l'isolement et la détermination de la structure du naphthopyranone. Il a participé à la préparation des solutions, la mesure de fluorescence, l'interprétation des résultats et la rédaction. DDT a participé à l'interprétation des résultats, la recherche bibliographique et la rédaction. IN a contribué à la mise au point du protocole expérimental pour l'extraction et l'isolement du naphthopyranone. Il a participé aussi à la détermination de la structure du naphthopyranone, l'interprétation des résultats

et la rédaction. AC a participé à l'interprétation des résultats et la rédaction du manuscrit.

REFERENCES

- Coly A. 2001. Détermination fluorimétrique et fluorimétrique induite photochimiquement de pesticides aromatiques et d'herbicides sulfonylurées : effet des milieux organisés, application analytique à la détermination de traces de pesticides dans l'environnement. Thèse d'Etat Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.
- Coly A, Aaron JJ. 2001. Simultaneous Determination of Binary Mixtures of Sulfonyleurea Herbicides in Water by First-Derivative Photochemically Induced Spectrofluorimetry. *Journal of AOAC International*, **84**: 1745-1750.
- Coly A, Aaron JJ. 2009. Simultaneous determination of sulfonyleurea herbicide synthetic binary mixtures by a partial least square method combined with micellar-enhanced photochemically-induced fluorescence application to tap water analysis. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **27**: 33-40.
- Mbow B, Ndiaye I, Coly A, Tine A. 2014. Etude des propriétés fluorescentes de l'antibactérien almazole D et C. Mise en évidence de la conversion photochimique de l'almazole D en C par voie fluorimétrique. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*, **038**: 15-21.
- Silva O, Gomes ET. 2003. Guieranone A, a naphthyl butenone from the leaves of *Guiera senegalensis* with antifungal activity. *Journal of Natural Products*, **66**(3): 447-449.
- Silva O. 2004. Monographic profile of *Guiera* leaves, a west African herbal drug. PhD Thesis, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Silva O, Serrano R, Gomes ET. 2008. Botanical characterization of *Guiera senegalensis* leaves. *Microscopy microanalysis*, **14**: 398-404.
- Thiaré DD, Khonté A, Sarr D, Diop C, Gaye-Seye MD, Coly A, Delattre F, Tine A, Aaron JJ. 2014. Solvolysis kinetic study and direct spectrofluorimetric analysis of the fungicide benomyl in natural waters. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **33**: 237-248.
- Thiaré DD, Khonté A, Diop A, Mendy A, Coly A, Delattre F, Gaye-Seye MD, Tine A. 2015a. Spectrofluorimetric analysis of the fungicide carbendazim and its metabolite 2-aminobenzimidazole in natural water. *American Journal of Analytical Chemistry*, **6**: 767-775.
- Thiaré DD, Khonté A, Diop A, Cissé L, Coly A, Tine A, Delattre F. 2015b. Determination of ground and excited state dipole moments of amino-benzimidazole by solvatochromic shift methods and theoretical calculations. *Journal of Molecular Liquid*, **211**: 640-646.
- Zerbo P, Millogo-Rasolodimby J, Nacoulma-Ouedraogo, Van Damme P. 2007. Contribution à la connaissance des plantes médicinales utilisées dans les soins infantiles en pays San, au Burkina Faso. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **1**(3): 262-274.