

## TP n° 01 : Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage du radical DPPH<sup>•</sup>

### 1. Rappel : Activité antioxydante des substances naturelles

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires.

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2^{\bullet}$ ).

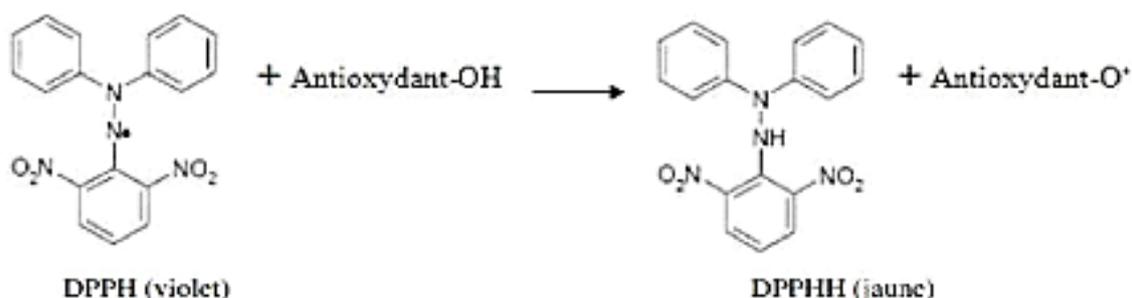
Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes  $\text{ROO}^{\bullet}$  par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter); ou les radicaux  $\text{ABTS}^{\bullet}$  (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre  $\text{DPPH}^{\bullet}$  (diphényl-picrylhydrazyle).

### 2. Principe de la méthode de $\text{DPPH}^{\bullet}$

Le  $\text{DPPH}^{\bullet}$  agit en tant qu'un radical libre stable efficace réduit par un antioxydant, montrant un spectre d'absorption à 517 nm avec une couleur violette, la réduction de ce radical nous donne la coloration jaune dont l'intensité est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants.



Où AH est un composé capable de céder un  $\text{H}^+$  au radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$ .



### 3. Objectif :

Le but de cette manipulation est la détermination de l'effet antiradicalaire des échantillons d'origine végétal (extraits de plantes) ou synthétiques vis-à-vis du radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$ .

#### 4. Produits et matériel :

##### 4.1. Produits utilisés :

- Diphényl-picrylhydrazyle (DPPH) : 0.1 mM (3.9 mg/50 ml d'Ethanol).
- Hydroxytoluène butylé (BHT) : 1 mg/ml (10 mg/10 ml de Méthanol).
- Echantillons 1mg/ml.
- Ethanol.
- Méthanol.
- Eau distillée.

##### 4.2. Matériel :

- Balance analytique.
- Spectrophotomètre.
- 02 Cuves en verre.
- Papiers joseph.
- Spatule.
- Verre de montre.
- Agitateur des tubes (vortex).
- 70 Tubes à essais de 5 ml.
- 02 Tubes à essais de 20 ml.
- 05 Porte tubes de 5 ml.
- 04 Béchers de 100 ml.
- Micropipettes (10-100 µl et 100-1000 µl).
- Pipettes de 01 et 02 ml + Propipettes.

#### 5. Mode opératoire :

1-Pipeter dans des tubes à essais :

##### La gamme du BHT

BHT µg/ml	Contrôle positif	10	20	30	50	70	90	110	150
BHT µl	00	10	20	30	50	70	90	110	150
Méthanol µl	500	490	480	470	450	430	410	390	350
DPPH µl	500	500	500	500	500	500	500	500	500

##### La gamme d'échantillon

Echantillon µg/ml	Contrôle positif	10	20	30	50	70	90	110	150
Echantillon µl	00	10	20	30	50	70	90	110	150
Ethanol µl	500	490	480	470	450	430	410	390	350
DPPH µl	500	500	500	500	500	500	500	500	500

2-Agiter les tubes préparés à l'aide d'un agitateur mécanique.

3. Incuber les tubes à l'obscurité pendant 30 min.

4. Mesurer l'absorbance (A) à 517 nm contre le blanc qui contient 500 µl méthanol + 500 µl éthanol (gamme de BHT) ou 1ml éthanol (gamme d'échantillon).

##### ❖ Calcul :

L'activité antiradicalaire est déterminée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

A<sub>c</sub> : Absorbance du contrôle.

A<sub>t</sub> : Absorbance du test.

#### 6. Résultats et interprétation :

- ❶ Calculer l'activité antiradicalaire du BHT et des échantillons.
- ❷ Tracer les courbes : activité antiradicalaire (%) = f ([Concentration (µg/ml)]) du BHT et des échantillons.
- ❸ Déterminer les IC<sub>50</sub> sachant que l'IC<sub>50</sub> est la concentration d'échantillon nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH.
- ❹ Représenter les IC<sub>50</sub> obtenues sous forme d'un histogramme.
- ❺ Interpréter les résultats obtenus.