

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Aboubekr BELKAID - TLEMCEM
Faculté des Sciences
Département de Chimie



MEMOIRE

En vue de l'obtention du

DIPLOME DE MASTER EN CHIMIE
Option : Catalyse et Chimie Verte

Présentée par :

M^{elle}. **Amel HAMHAMI**

THÈME

“Synthèse et réactivité de la purpurogalline”

Soutenu le 30 juin 2013

Devant le jury composé de :

Président :	Mme. Ilhem REKKAB	M.C.B. à l'Université UABB, Tlemcen
Encadreur :	Mr. Bachir MOSTEFA-KARA	Professeur à l'Université UABB, Tlemcen
Examineur :	Mr. Noureddine CHOUKCHOU-BRAHAM	Professeur à l'Université UABB, Tlemcen
Examineur :	Mr. Chewki ZIANI-CHERIF	Professeur à l'Université UABB, Tlemcen

Année Universitaire : 2012-2013

DEDICACE

Je dédie se travail à

Mes très chers parents pour leur sacrifice, amour, tendresse et encouragement.

Mes chères sœurs : LAILA, IKRAME et la petite KHADIDJA.

Mon cher frère : Abed NOUR.

Toute ma famille

Mes meilleurs amis : I.SIFI, F.MEHDI

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO) de l'Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, sous la direction de Monsieur **B. MOSTEFA-KARA**, Professeur à l'Université de Tlemcen, à qui j'exprime mes vifs remerciements pour son encadrement, son aide, ses conseils et sa disponibilité tout au long de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie très sincèrement Messieurs **R. BACHIR** et **A. CHOUKCHOU-BRAHAM** Professeurs à l'université de Tlemcen, pour m'avoir accueilli respectivement, au laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique et dans le master de Catalyse et Chimie Verte.

Je tiens à remercier également Madame **I. REKKAB**, Maître de Conférences à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Mes remerciements vont également à Monsieur **N. CHOUKCHOU-BRAHAM**, Professeur à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté de faire partie du jury, pour ses encouragements et son aide tout au long de mon travail.

Je tiens à remercier également Monsieur **C. ZIANI-CHERIF**, Professeur à l'université de Tlemcen, pour ses conseils et ses aides ; qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa présence au jury.

Je remercie aussi Monsieur **D.VILLEMIN**, Professeur à l'université de Caen, pour son aide (analyses spectroscopiques) et ses conseils, ainsi que Melle **D. CHOUIKHI**, Docteur de l'université de Strasbourg, pour ses analyses.

Je remercie particulièrement, **S. BENZERDJEB**, **F. MOKRI**, **M. BENABDELLAH**, **G. FEROUANI** et **F. BELHADJ** pour l'aide et le soutien qu'ils m'ont apporté durant tout mon travail.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes du laboratoire de catalyse et Synthèse en Chimie Organique, tous les étudiants du Master de Catalyse et Chimie Verte et plus particulièrement à **S.ATTAR**, **F.NOUALI**, **A.ZAOUI**, **A.SELKA**, **A.ABIDLI**.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail.

Table des matières

ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION GENERALE	2
CHAPITRE I : Etude bibliographique	
I. Les polyphenols	3
1. Classification des polyphenols naturels	3
2. Propriété biologique des polyphenols	4
3. Propriété pro-oxydantes des polyphenols	4
4. Propriété chimique des polyphenols	5
II. Les réactions enzymatiques	5
1. C'est quoi une enzyme.....	5
2. Propriété des enzymes dans les réactions chimiques	5
3. Propriété des enzymes dans les réactions chimiques	6
4. Les oxydoréductases	6
III. Les tropolones et les benzotropolones	7
1. Tropolone et Benzotropolone	7
2. La colchicine	8
3. La purpurogalline	9
3-1 Propriété médicinales.....	9
3-2 Synthèse de la purpurogalline	9
3-3 Réactivité de la purpurogalline.....	10
IV. Conclusion	11
CHAPITRE II : Résultats et discussion	
I. Synthèse de la purpurogalline	12
1. Par voie chimique	13
2. Par voie enzymatique.....	13
2-1.Par l'extrait de radis noir (HSR)	14
2-2.Par l'extrait de radis rouge	15
2-3.Par l'extrait de navet	15
2-4.Par l'extrait d'oignon	17
2-5. Par l'extrait d'ail.....	18
II. Réactivité de la purpurogalline	19
1. Protection du groupement OH	19
2. Réaction de Pechman.....	20
CONCLUSION GENERALE	22
Références bibliographiques	23
CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE	25
ANNEXE : Analyses Spectroscopiques	34

ABBREVIATIONS

AC₂O : l'anhydride acétique.

arom : aromatique.

°C : degré Celsius.

CHCl₃ : chloroforme.

δ : déplacement chimique.

d : doublet.

DMSO : diméthyle sulfoxyde .

éq : équivalent.

g : gramme.

¹H: proton.

HSR : Horseradish .

HRP : Horseradish Peroxydase.

H_z : hertz.

IR: infrarouge.

J : constante de couplage.

ml : millilitre.

MO : micro-ondes.

PPOs : polyphenols oxydase.

Rdt : rendement.

R_f : rapport frontal.

RMN : résonance magnétique nucléaire.

s : singulet.

tamb : température ambiante.

trop : tropolone.

T_f : température de fusion.

t : triplet .

Introduction Générale:

L'alimentation est la première des thérapies. Si l'on connaît les ennemis de la santé qui se cachent dans nos assiettes, qui sont nos alliés ?

Les polyphénols représentent l'un des groupes les plus importants du métabolisme secondaire. Très abondants dans les fruits et légumes, ils présentent une faible toxicité et ils protègeraient de nombreuses maladies (cancers, maladies cardiovasculaires, maladies inflammatoires et neuro-dégénératives, ...).

Dans la famille des polyphénols, nous nous sommes intéressés aux benzotropolones, et plus particulièrement à la purpurogalline qui est un produit d'oxydation du pyrogallol.

L'oxydation du pyrogallol peut être réalisée soit de manière chimique, soit de manière enzymatique.

Dans notre travail, nous avons expérimenté divers extraits de légumes (à différentes concentrations et à différents pH) pour effectuer l'oxydation du pyrogallol. Nous avons fait réagir la purpurogalline, ainsi préparée, dans la réaction de Pechman pour la formation d'une coumarine.

Le manuscrit sera donc articulé de la manière suivante :

- ✓ Une partie bibliographique dans laquelle nous définirons les polyphénols, les réactions enzymatiques, les benzotropolones, ainsi que certains composés analogues de la purpurogalline.
- ✓ Une partie théorique où nous présenterons et discuterons les résultats obtenus
- ✓ Enfin, une partie expérimentale, dans laquelle seront décrits tous les modes opératoires mis au point.

CHAPITRE I :

Etude Bibliographique

I. Les polyphénols :

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles.

Les polyphénols sont des métabolites secondaires. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales ; c'est pourquoi 80% des composés phénoliques sont essentiellement localisés dans les tissus épidermiques des plantes.

Ce sont des phytoconstituants, généralement des pigments, responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge...etc).

Ils sont associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation...

Ces composés jouent aussi un rôle important dans la qualité alimentaire des fruits et déterminent ainsi leur saveur.

Les polyphénols se répartissent dans toutes les parties de la plante : les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles.

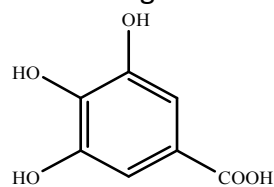
1. Classification des polyphénols naturels [1] [2] [3]:

Une classification de ces substances a été proposée par HARBORNE en 1980

On peut distinguer les différentes classes de polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure du squelette de base.

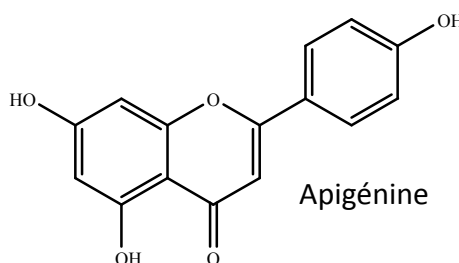
Trois principales classes sont largement répandues :

- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques).
- Les flavonoïdes.
- Les tanins et lignines.



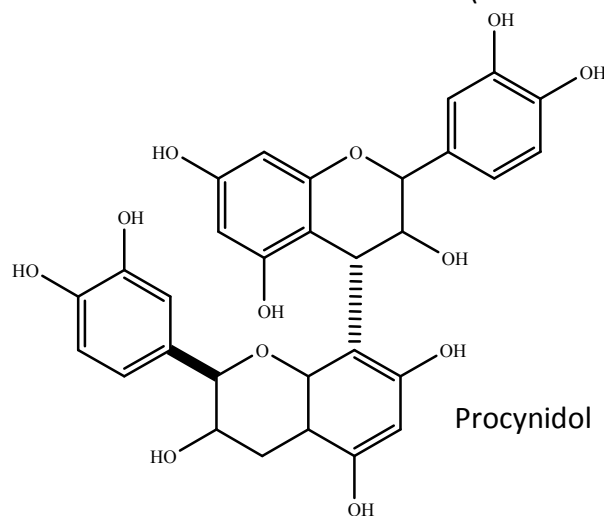
Acide Gallique

(Les acides phénoliques)



Apigénine

(Les Flavonoïdes)



Procyanidol

(Les tanins)

2. Propriétés Biologiques des polyphénols :

Les propriétés biologiques des polyphénols proviennent essentiellement de leur activité réductrice et de leur affinité pour une grande variété de protéines.

De nos jours, les polyphénols sont largement étudiés dans le domaine médical où on leur a découvert des activités anti-tumorales, anti-inflammatoires antiallergiques et anti-cancer. Ils sont également actifs sur l'obésité, le diabète.

Effet antiallergique [4] :	Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine.
Effet anti-inflammatoire [5] :	Sous l'action de la cycloxygénase et la lipoxygénase, l'acide arachidonique est métabolisé respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires.
Effet anti-ulcère [6] :	Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction des ulcères et la protection des cellules gastriques.
Effet anti-cancer [7] :	Présente dans tous les types de thé, la catéchine a montré une activité anti-tumorale. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde à inactiver l'action de la P-glycoprotéine qui est impliquée dans la résistance phénotypique des cellules cancéreuses.
Autres activités biologiques [8] :	Les polyphénols peuvent aussi prévenir le développement du diabète en inhibant l'enzyme aldose réductase. Certains flavonoïdes peuvent inhiber l'athérosclérose et par conséquent réduire le risque des maladies cardiovasculaires. Les effets antiviraux des flavonoïdes ont été également démontrés

3. Propriétés pro-oxydantes des polyphénols [9]:

Certains polyphénols particulièrement réducteurs peuvent manifester une activité pro-oxydante en entrant dans des cycles redox qui génèrent des ROR. Par exemple, l'acide gallique est capable de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} , ou Cu^{2+} en Cu^{+} , et ainsi d'enclencher la réaction de Fenton avec formation du radical hydroxyle.

Le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la réaction est produit par autoxydation des ions de basse valence. Par leurs effets pro-oxydants, certains flavonoïdes peuvent promouvoir la dégradation oxydante de l'ADN.

La signification biologique de ces effets pro-oxydants est dépendante de la présence d'ions du fer libres, c'est-à-dire non liés aux protéines.

4. Propriétés chimiques des polyphénols:

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques [10]. Ceux sont généralement des noyaux riches en électrons, à cause des effets donneurs des groupements hydroxyle. Les propriétés chimique qui en découlent sont diverses et variées: réaction de Pechman (formation d'une coumarine), réaction de Mannich (formation d'amine), ...etc. La réaction d'oxydation des polyphénols est l'une des réactions phares de la chimie biologique (biochimie et chimie des aliments); elle peut se faire de manière :

- Chimique
- Enzymatique

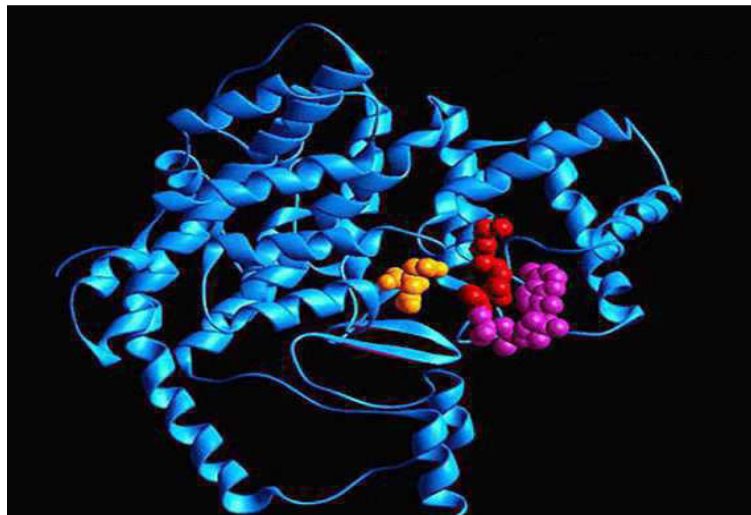
II. Les réactions enzymatiques:

Une réaction enzymatique est une réaction chimique ou biochimique catalysée par une enzyme.

1. C'est quoi une enzyme ?:

Une enzyme est une protéine qui joue un rôle de catalyseur biologique (ou biocatalyseur), c'est-à-dire de composé qui facilite une réaction biochimique sans en modifier les produits. Elle est capable d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme, sans pour autant modifier l'équilibre formé. Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intactes en fin de réaction.

La partie importante de l'enzyme est constituée du site actif. C'est dans ce site, qui prend souvent la forme d'une cavité, que se fixe le substrat qui pourra alors être soumis à l'action de l'enzyme afin de le transformer en produit [11].



2. Propriétés des enzymes dans les réactions chimiques [12]:

- Les enzymes ont un pouvoir catalytique de 10^6 à 10^{12} fois supérieur aux réactions non catalysées, et de plusieurs ordres de grandeur supérieur aux réactions catalysées par des catalyseurs chimiques.

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- Les réactions enzymatiques se font dans des conditions douces : (dans l'eau, à pH précis, température ambiante).
- Les réactions enzymatiques sont très spécifiques : à la fois pour le substrat et pour le type de réaction.
- Les réactions enzymatiques peuvent être modulées : La régulation de l'activité enzymatique peut s'effectuer de façon allostérique, par des protéines régulatrices, par une modification covalente de l'enzyme, par une activation protéolytique, par la quantité d'enzyme produite, ...etc.

3. Classification des enzymes:

Selon la commission des enzymes de l'I.U.B. (*International Union of Biochemistry*) [13], les enzymes se répartissent en six grandes classes (Tableau 1). Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases [14]

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases (EC 1.x.x.x)	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atome d'hydrogène).
Transférases (EC 2.x.x.x)	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, ... etc.).
Hydrolases (EC 3.x.x.x)	Réactions d'hydrolyse.
Lyases (EC 4.x.x.x)	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse.
Isomérasés (EC 5.x.x.x)	Réactions d'isomérisation.
Ligases (EC 6.x.x.x)	Formation de liaisons chimiques

Tableau 1: Les six grandes classes d'enzymes

4. Les Oxydoréductase [15]:

Dans la nature, il existe deux grands types d'oxydoréductases : les peroxydases et polyphenols oxydases :

✓ Peroxydase :

Les peroxydases (E.C. 1.11.1.7) sont des hémoprotéines produit principalement par un des micro-organismes et qui sont produites industriellement. Elles catalysent des réactions en présence de peroxyde d'hydrogène. On peut citer à titre d'exemple :

Peroxydase de horseradish(HRP), Peroxydase de Lignine (LiP), les chloroperoxydase (CPO), Peroxydase de Manganèse (MnP)...etc.

✓ Polyphenols oxydase :

Les polyphenols oxydase (PPOs) sont des oxydoréductases qui catalysent l'oxydation des composés phénoliques. Deux sous-classes largement étudiées et utilisées, on peut citer : les tyrosinases et les laccases qui réagissent avec l'oxygène d'air.

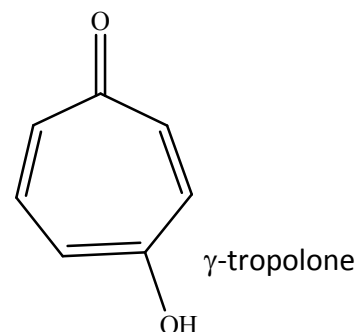
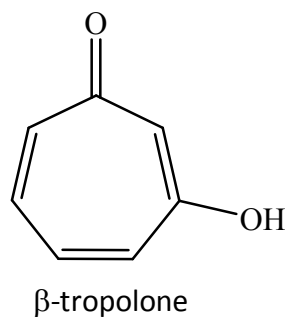
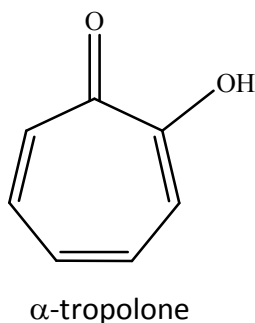
On dose l'activité des oxydoréductases en équivalent de réducteur (pyrogallol) transformé en purpurogalline (benzotropolones).

III. Les Tropolones et les Benzotropolones :

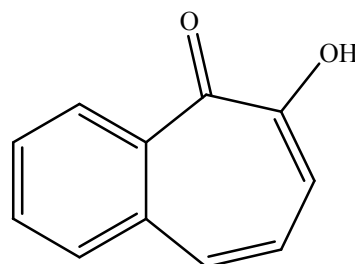
1. Tropolone et Benzotropolone:

La **tropolone** est un dérivé de la tropone, porteur d'un groupe hydroxyle. Il existe trois isomères de la tropolone [16]:

- l' **α -tropolone** ou 1,2-tropolone, le plus stable des isomères, appelé par abus de langage «tropolone».
- la **β -tropolone** ou 1,3-tropolone.
- la **γ -tropolone** ou 1,4-tropolone.



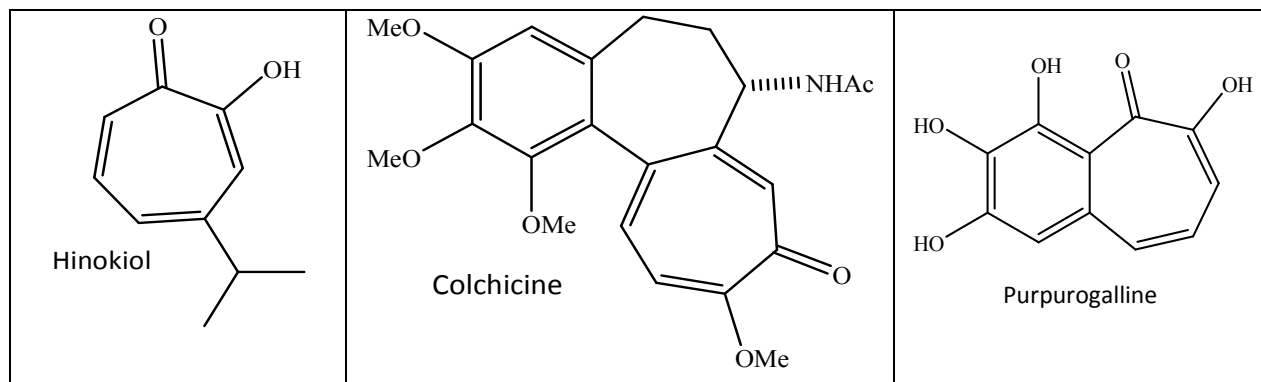
Les **benzotropolones** sont, quant à eux, des composés aromatiques bicycliques, constitués d'un cycle tropolone accolés à un cycle benzénique [19].



CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

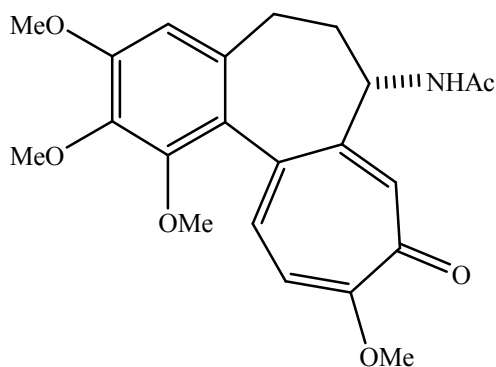
Les squelettes de la tropolone et de la Benzotropolone sont retrouvés dans de nombreux produits naturels, dont beaucoup possèdent des activités biologiques intéressantes : agent antimototique [20], antioxydant [17], antibactérien [18], ...

On peut indiquer par exemple:



2. La Colchicine [21]:

La colchicine est un alcaloïde tricyclique très toxique extrait d'une plante bulbeuse *Colchicum autumnale* qui fleuri en automne après avoir perdu ses feuilles.



A forte dose, la colchicine est toxique, mais à faible dose elle interagit avec certain composant du système immunitaire qui intervient dans les réactions inflammatoires.

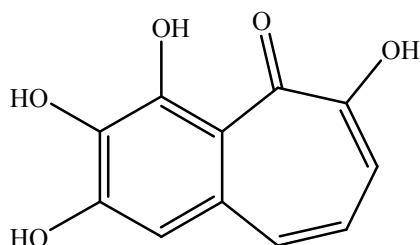
❖ Propriétés médicinales [22]:

La colchicine est souvent prescrite pour traiter certaines maladies comme :

- Les crises de goutte.
- La fièvre méditerranéenne familiale.
- Le traitement de certains effets secondaires des cancers.
- Contre les maladies cardio-vasculaires (Péricardite récidivante).
- Aphtes à répétition.

3. La Purpurogalline:

La purpurogalline est un produit phénolique cristallin rouge qui constitue l'aglycone d'un hétéroside extrait de la noix de galle. Elle peut être aussi obtenue de manière synthétique par oxydation du pyrogallol.



3-1 Propriétés médicinales:

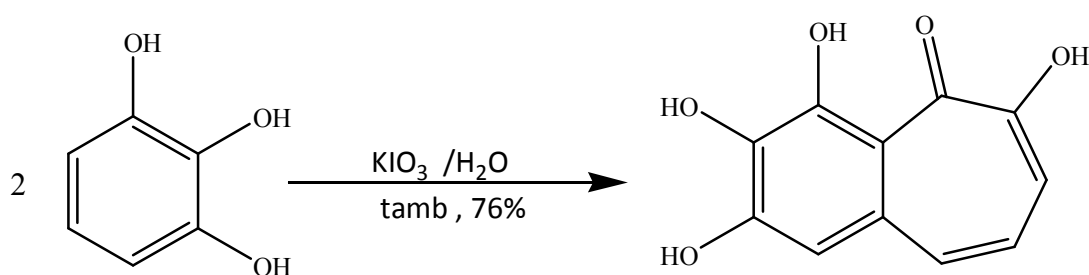
La purpurogalline est connue pour ses activités antibactériennes [23], antioxydantes [24], anticancéreuses [25].

3-2 Synthèses de la Purpurogalline:

La purpurogalline est obtenue principalement par oxydation du pyrogallol.

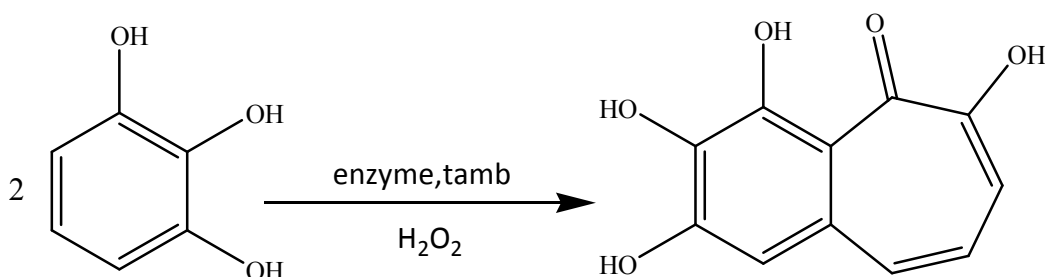
- Par voie chimique [26]:

L'oxydation de pyrogallol est réalisée par KIO_3 comme oxydant dans l'eau, à température ambiante pendant 16h.



- Par voie enzymatique [27]:

L'oxydation par voie enzymatique est très facile et se fait dans l'eau, à température ambiante. Dans la littérature, on retrouve divers types d'enzymes oxydoréductases comme HSR et laccase.

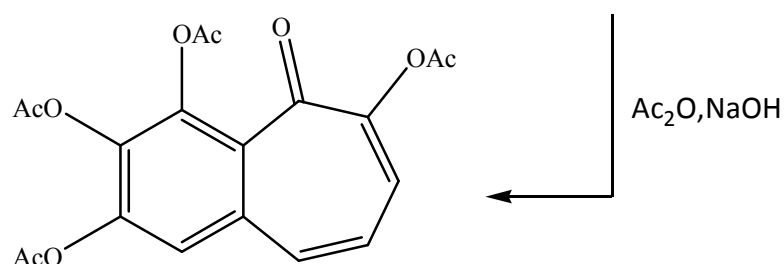
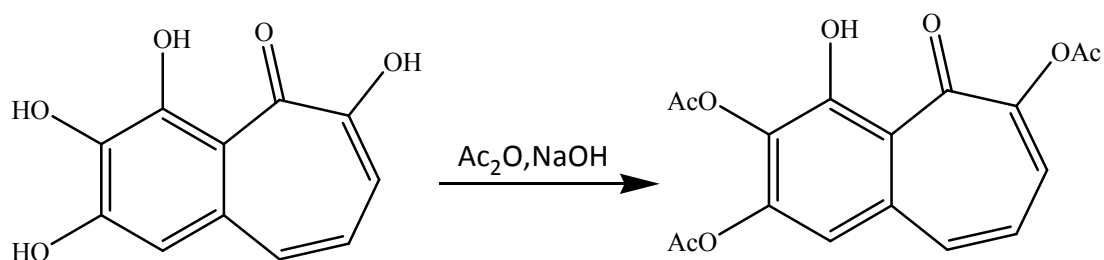


3-3 Réactivité de la purpurogalline:

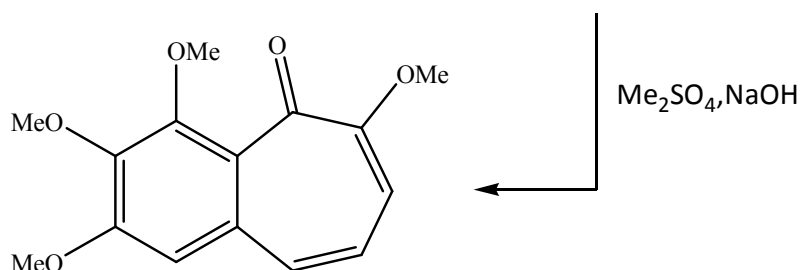
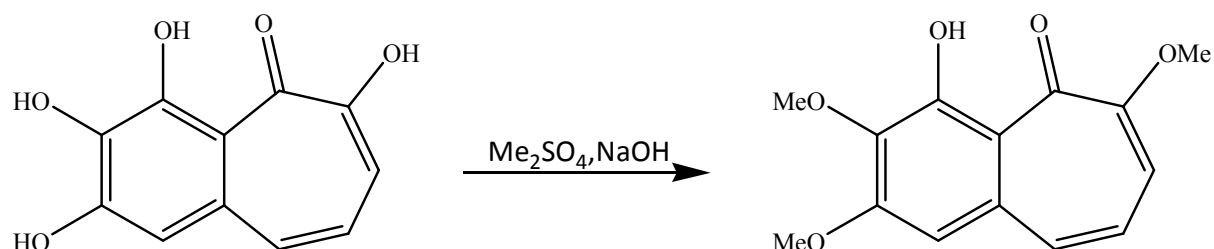
A. Protection des groupements hydroxyle de la purpurogalline:

La protection des groupements OH de la purpurogalline se fait par plusieurs types de groupements protecteurs. On citera à titre d'exemple :

➤ Protection par l'anhydride acétique [28]:

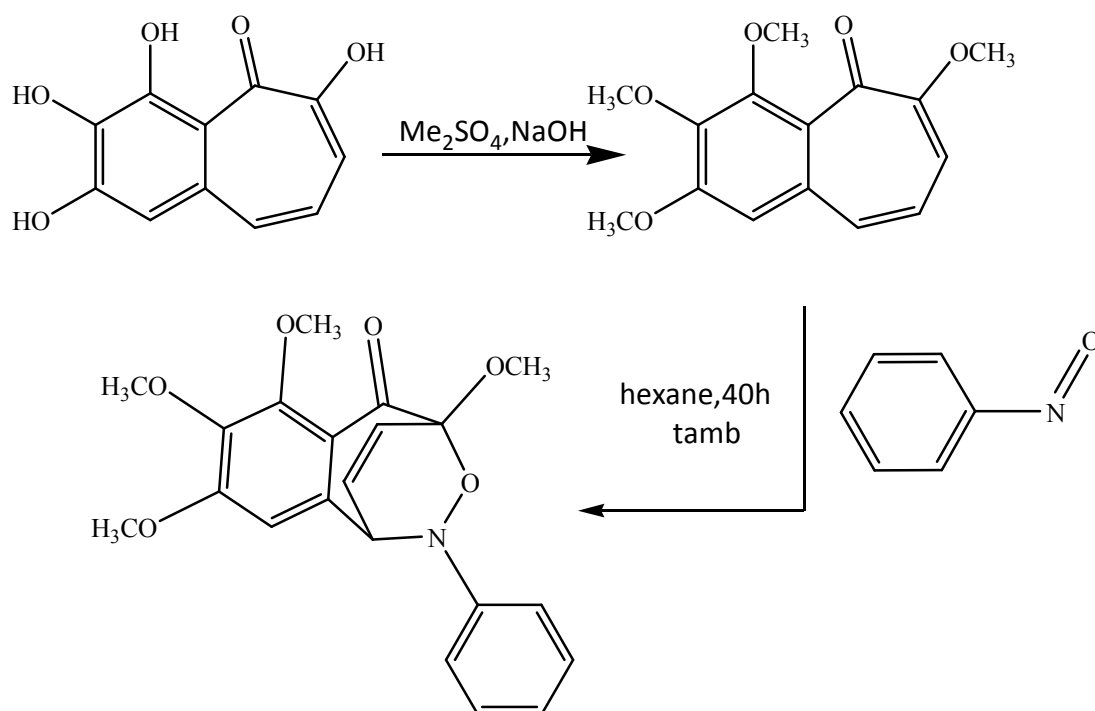


➤ Protection par le diméthyl sulfate [28]:



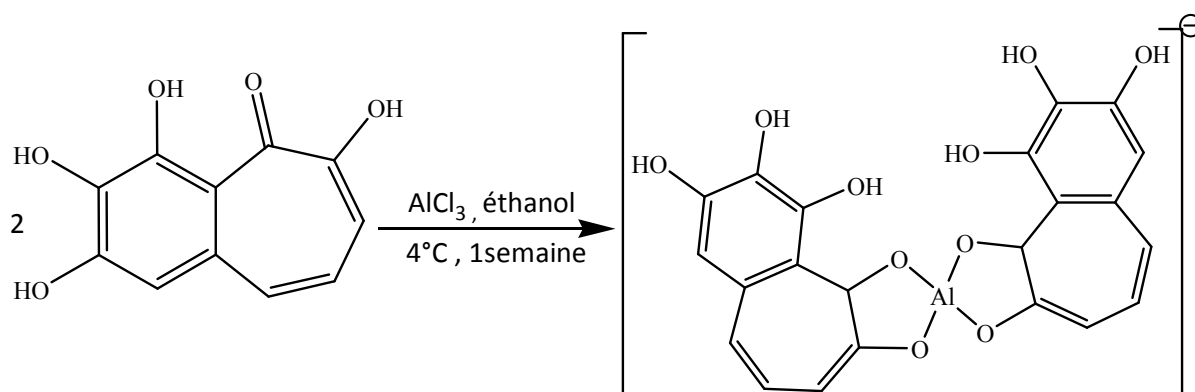
B. Réaction de cycloaddition [29]:

Le motif diénique de la purpurogalline peut être utilisé pour effectuer des réactions de cycloaddition.



C. Application de la purpurogalline [30] [31]:

La purpurogalline peut être utilisée dans le domaine de l'environnement. Elle forme, par extraction liquide-liquide, des complexes avec certains métaux.



IV- Conclusion:

A travers ce chapitre, nous avons abordé quelques généralités sur les polyphénols, les réactions enzymatique, les tropolones et les benzotropolones puis nous avons donné quelques exemples des molécules contenant la structure des benzotropolones avec quelques propriétés biologiques. En suite nous avons passé en revue les deux différentes méthodes de synthèse de la purpurogalline dans la littérature et en fin nous avons terminé par une revue sur la réactivité de la purpurogalline.

CHAPITRE II:

Résultats et discussion

I. Synthèse de la purpurogalline :

Dans un premier temps nous avons voulu, à travers ce travail, préparer de la purpurogalline par oxydation du pyrogallol (schéma 1).

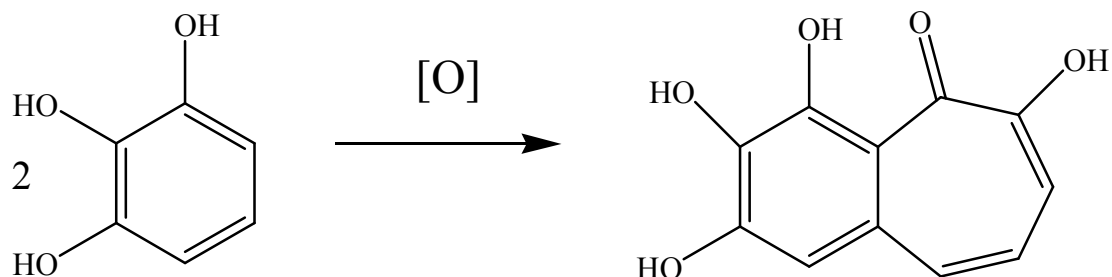


Schéma 1

L'oxydation peut avoir lieu de 2 manières différentes :

- ✓ Soit par voie chimique
- ✓ Soit par voie enzymatique.

Mécanisme proposé pour la synthèse de la Purpurogalline:

Un mécanisme de formation de la purpurogalline influencé de celui proposé dans la littérature [32] serait selon le schéma 2:

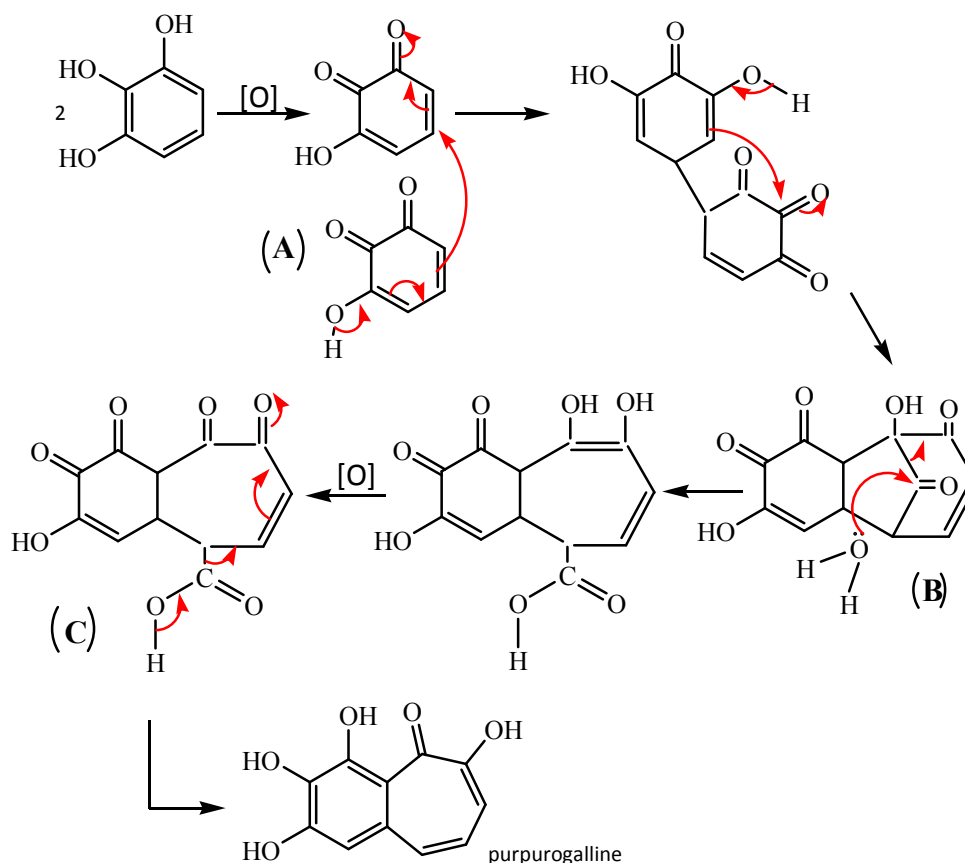
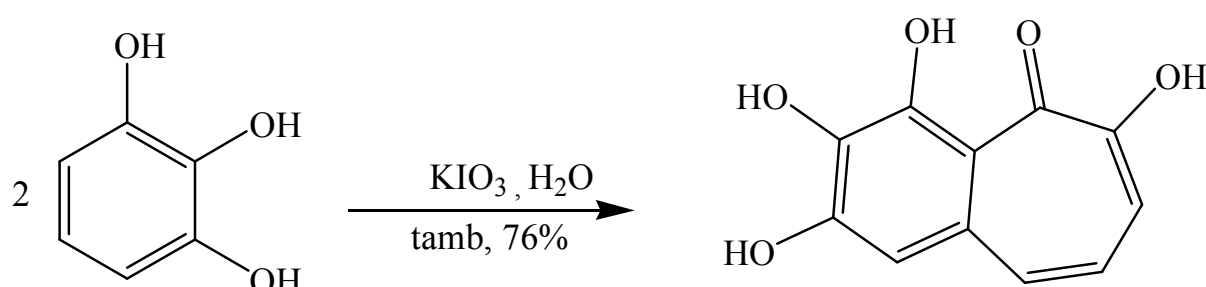


Schéma 2

Nous remarquons, dans le mécanisme, que la réaction débute par la formation d'une 1,2-benzoquinone (A) qui va subir une réaction de Michael sur elle-même avec formation d'un Tri cycle (B) qui se ré-oxyde de nouveau en produit (C). L'acide carboxylique (C), ainsi formé, est décarboxylé en présence d'eau pour donner la purpurogalline.

1) Par voie chimique :

L'oxydation du pyrogallol en purpurogalline par KIO_3 est décrite dans la littérature [26]. Elle se fait dans des conditions douces de température.



Schémas 3

Pour notre part, nous avons reproduit cette synthèse en essayant de maintenir la température entre 0 et 5°C. Malgré ces conditions, la purpurogalline obtenue n'est pas très pure. La recristallisation du produit, plusieurs fois dans l'acide acétique, est nécessaire à cause des sous-produits d'oxydation ; ce qui diminue quelques peu les rendements. Ce qui nous a amené à chercher une autre voie d'accès à la purpurogalline par voie enzymatique.

2) Par voie enzymatique :

Les enzymes permettant d'effectuer des réactions d'oxydoréduction sont très répandues dans la nature [33]. Elles permettent la maturation de certains fruits et légumes en effectuant une réaction d'oxydation des polyphénols présents.

La synthèse de la purpurogalline, utilisant des enzymes telles que HSR peroxydase et la laccase sont décrites dans la littérature [32], [27].

La réaction est basée sur l'utilisation, d'une solution d'eau oxygénée (diluée) pour la peroxydase et uniquement l'oxygène de l'air pour les laccases (schéma 4).

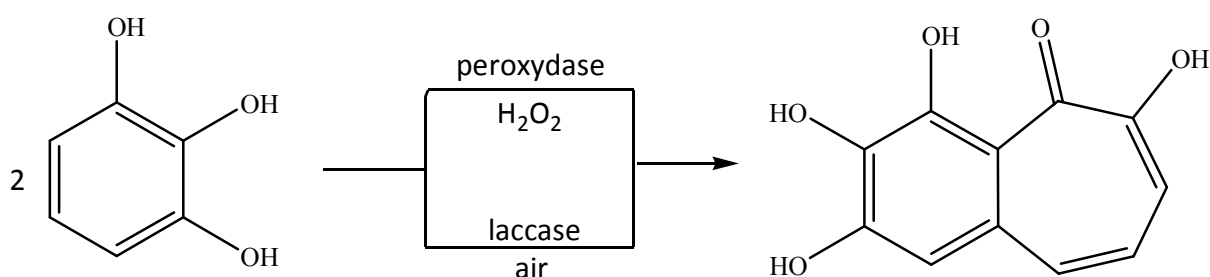


Schéma 4

Devant la difficulté d'obtenir des enzymes pures, nous avons tenté, dans notre travail, de préparer la purpurogalline à partir du pyrogallol, en utilisant des extraits de légumes susceptible de contenir des peroxydases. Ce type d'enzymes nécessite l'emploi d'une solution diluée d' H_2O_2 .

Réaction générale :

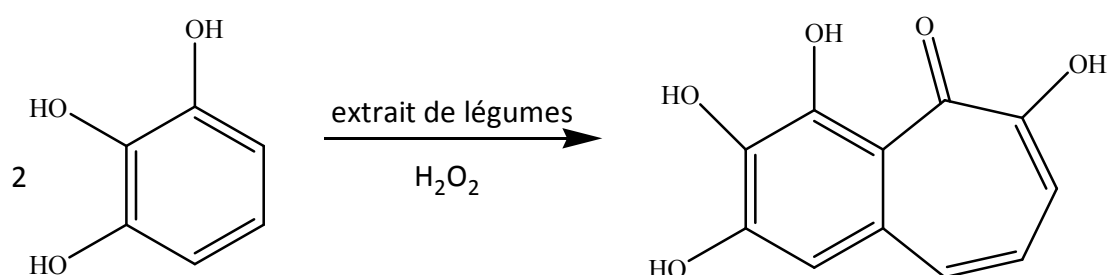


Schéma 5

Nous avons choisi d'utiliser cinq types de légumes : le radis noir (horseradish), une variété de navet propre la région de Tlemcen (*Rhaphanus Sativus L.*), le radis rouge (variétés locale), l'oignon (variété locale) et l'ail (variété locale)

Les extraits de légumes ont été préparés de la même manière pour chaque légume (voir partie expérimentale). Nous avons, cependant, fait varier certains paramètres (concentration, pH, durée d'introduction) pour certains légumes.

2-1. Oxydation par l'extrait de radis noir (HSR) :

L'utilisation de ce légume est décrite dans la littérature [33]. Pour améliorer le rendement en purpurogalline, nous avons utilisé différentes concentration en légumes selon le tableau 1 suivant :

concentration de légume g/ml	0,2	0,4	0,6
Rdt%	11	14	11

Tableau 1

Nous remarquons que la concentration, dans le cas du radis noire, n'influe pas beaucoup, sur les rendements qui ne sont pas très bon.

2-2. Oxydation par l'extrait de radis rouge :

Comme dans le cas précédent nous avons préparé la purpurogalline en faisant varier la concentration selon le tableau 2:

concentration de légume g/ml	0,2	0,4	0,6
Rdt%	11	13	11

Tableau 2

L'utilisation de l'extrait de radis rouge n'as pas permis, quelle que soit la concentration, d'augmenter les rendements de la réaction.

2-3. Oxydation par l'extrait de navet:

Nous tenons à spécifier que le navet utilisé dans cette étude, est une variété locale de la région de Tlemcen.

Nous avons choisi ce légume pour mener une étude tenant compte de plusieurs paramètres :

- ✓ concentration en extrait de légumes (variation de la masse de matière végétale).
- ✓ temps et fréquence d'introduction de l'extrait de légume et de la solution de H₂O₂.
- ✓ pH de la solution d'extrait de légume.

➤ **La variation de concentration d'extrait de navet:**

Dans ce cas, nous avons fait varier la concentration de la masse végétale. Les enzymes donnent généralement de bons résultats à des concentrations bien précises. Nous avons recherché la concentration en légume qui donnait le meilleur rendement pour la réaction d'oxydation du pyrogallol. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3.

Concentration d'extrait de navet g/ml.	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Rdt %	11	15	25	25	11

Tableau 3

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

La courbe suivante (**figure1**) montre bien que l'extrait de légume donne les meilleurs rendements pour des concentrations variant de 0,4 à 0,5 g/ml ; c'est-à-dire que l'efficacité de l'extrait de navet passe par un optimum :

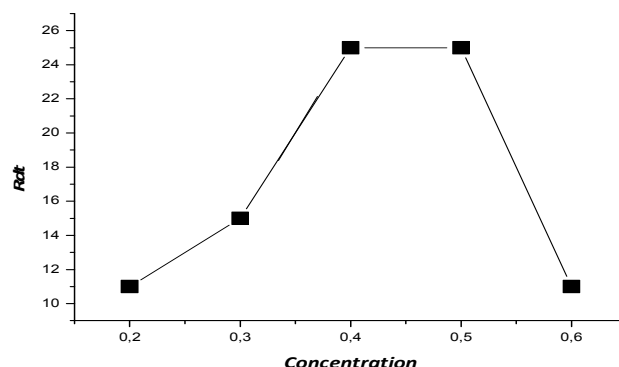


Figure 1

➤ Variation du temps et de la fréquence d'introduction des solutions d'extrait de navet et d' H_2O_2 :

Dans ce cas, nous avons introduit les mêmes quantités d'extraits de navet et de solution d' H_2O_2 par portions, à des intervalles de temps différents. En fonction des temps et des fréquences d'ajouts des solutions, on a établi 3 méthodes selon :

- ✓ Méthode 1 : toutes les 2 heures pendant 6 heures (3 x 20 ml d' H_2O_2 + 3 x 20 ml d'extrait de navet).
- ✓ Méthode 2 : toutes les heures pendant 6 heures (6 x 10 ml d' H_2O_2 + 6 x 10 ml d'extrait de navet).
- ✓ Méthode 3 : toutes les 30 minutes pendant 6 heures (12 x 5 ml d' H_2O_2 + 12 x 5 ml d'extrait de navet).

Les rendements obtenus pour la réaction d'oxydation sont (Tableau 4):

Tableau 4

Méthode 1	Rdt = 36 %
Méthode 2	Rdt = 34 %
Méthode 3	Rdt = 25 %

Ce que nous remarquons à travers ces résultats : c'est que nous augmentons le rendement en fractionnant et en ajoutant les solutions d'extrait et de H_2O_2 , toutes les 2 heures. Il est inutile d'augmenter la fréquence et de diminuer le temps (30 minutes).

➤ Variation du pH de la solution d'extrait de navet :

Dans tout notre travail, nous avons préparé les solutions d'extrait de légumes dans l'eau distillée au pH de l'eau distillée (pH \approx 5,2). Les rendements de la réaction d'oxydation ne dépassent pas 36%, dans ces conditions de pH.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

En fonction de la nature de l'enzyme, son efficacité est maximum à un pH bien précis. Dans le cas de l'extrait de navet, nous avons, alors fait varier le pH de la solution d'extrait de légumes pour optimiser les rendements.

Selon les pH utilisés, nous obtenons les résultats suivants (Tableau 5) :

pH	2,6	3,36	4,15	5,57	6,21	6,97	7,7	8,36
Rdt %	20	24	26	49	78	54	52	39

Tableau 5

Les résultats sont aussi présentés sous forme d'une courbe (figure 2) :

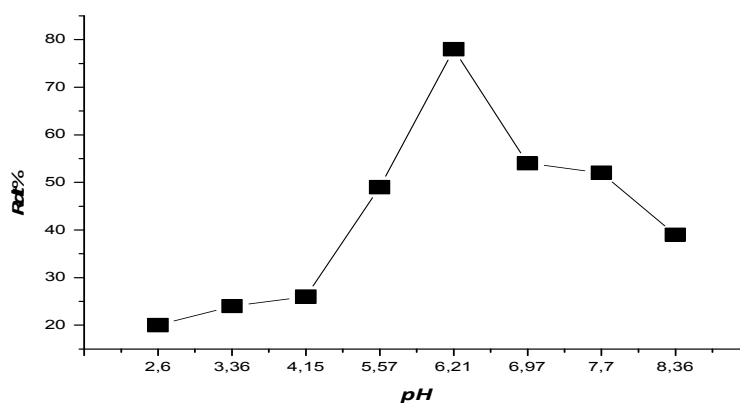


Figure 2

En préparant l'extrait de navet dans différentes solutions tampons, nous améliorons considérablement le rendement en purpurogalline, jusqu'à atteindre 78% pour un pH de 6,21. Le grand avantage de cette méthode est l'obtention de la purpurogalline sous forme pure sans difficulté (simple filtration du précipité).

2-4. Oxydation par l'extrait d'oignon:

Nous nous sommes influencés d'une réaction décrite dans la littérature, qui consistait à faire réagir le catéchol avec la 4-hydrox coumarine [34], pour essayer dans le cas de ce légume, d'effectuer la réaction d'oxydation du pyrogallol, une première fois en présence de la solution d'H₂O₂, et une seconde fois en n'ajoutant pas de H₂O₂.

Extrait d'oignon dans l'eau distillée + Solution de H ₂ O ₂	Rdt = 14%
Extrait d'oignon dans l'eau distillée	Rdt = 18%

Tableau 6

Les deux méthodes donnent le même produit final : la purpurogalline avec des rendements différents, mais la grande particularité, de l'oignon par rapport aux autres légumes que nous

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

avons utilisé, est que l'extrait de d'oignon oxyde aussi bien en présence de H_2O_2 que sans H_2O_2 (uniquement avec l'oxygène de l'air). Cela prouve bien que l'oignon possède 2 types d'enzymes oxydoréductases: une peroxydase (qui oxyde en présence d' H_2O_2) et éventuellement une laccase (qui oxyde avec O_2 de l'air) qu'il faudra confirmer.

Cet extrait de légumes devra faire l'objet d'une étude plus approfondie (variation de pH, concentrations, ...etc).

2-5. Oxydation par l'extrait d'ail:

Nous avons étendu le travail initié sur l'oignon à un autre légume : l'ail.

Dans notre travail nous avons d'abord épluché la gousse d'ail, mais l'extrait, ainsi préparé, n'a pas donné de résultats.

Nous avons, alors, utilisé la gousse d'ail entière (sans l'éplucher) pour préparer l'extrait.

De la même manière qu'avec l'extrait d'oignon, nous avons utilisé l'extrait d'ail avec une solution d' H_2O_2 (méthode 1) et sans H_2O_2 (méthode 2).

Méthode 1 : Extrait d'ail + sol. de H_2O_2 .	Rdt en Purpurogalline = 30%.
Méthode 2 : Extrait d'ail.	Rdt en produit inconnu = 48%.

Tableau 7

Dans ce cas, nous obtenons 2 produits différents, selon la méthode utilisée.

La méthode 1 : Donne de la purpurogalline avec un rendement de l'ordre de 30%, sans avoir optimisé les conditions de la réaction (pH, concentrations, ...etc), ce qui est assez appréciable. D'après ce résultat, l'ail contient donc une peroxydase.

La méthode 2 : Donne un autre produit qui a un aspect et dont le R_f et l'IR sont différents de ceux de la purpurogalline (reste à identifier par RMN et SDM). Nous pouvons conclure que l'ail possède d'autres enzymes qui réagissent sur le pyrogallol.

II. Réactivité de la purpurogalline:

Même si le travail qui m'a été attribué pour mon mémoire de master consistait à préparer de la purpurogalline par oxydation enzymatique du pyrogallol, par divers extrait de légumes, nous avons également tenté de faire réagir la purpurogalline selon la réaction de Pechman. Pour cela nous avons, dans un premier temps, protégé les groupements OH de la purpurogalline.

1. Protection des groupements OH de la Purpurogalline:

La protection des groupements OH phénoliques de la purpurogalline a fait l'objet de travaux décrits dans la littérature [28]. Les auteurs de ces travaux étudient la réactivité des différents OH vis-à-vis d'une réaction d'acétylation, puis d'une réaction de méthylation.

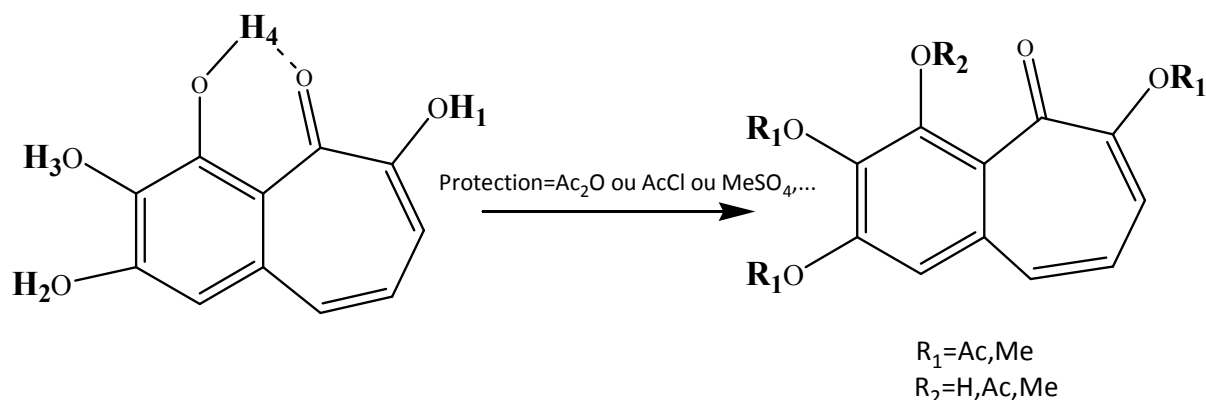


Schéma 6

On remarque, alors que les OH n'ont pas tous la même réactivité. En fonction de la stœchiométrie utilisée et des conditions opératoire, Les protons H2 et H3 sont les premiers à réagir, c'est ensuite au tour du proton énolique H1, enfin le proton H4 qui a réactivité moindre du fait qu'il se trouve lié par liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement carbonyle.

Dans notre cas, nous avons effectué l'acétylation avec un excès d'anhydride acétique, dans divers milieu acide (schéma 7).

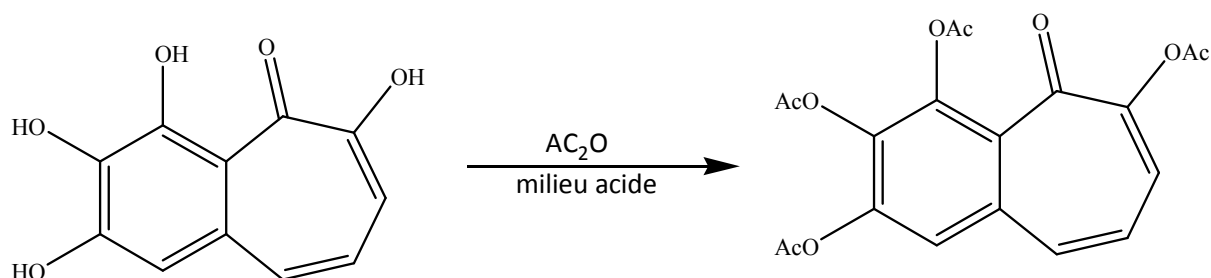


Schéma 7

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

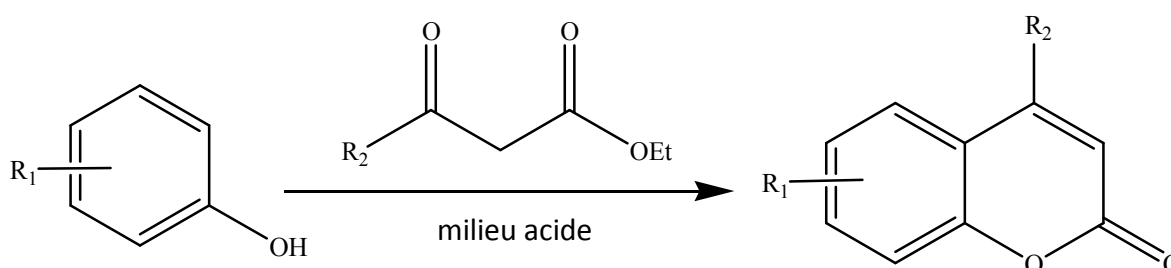
Nature de l'acide	Nombre d'éq d' Ac ₂ O	Rdt %	Pureté (R _f)
H ₂ SO ₄ (96 %)	5	-	trois tâches.
H ₂ SO ₄ (96 %)	7	-	trois tâches.
H ₂ SO ₄ (96 %)	10	48,5%	Mono tâche (0,75).
APTS	7	49,5 %	Mono tâche (0,77).
AcOH	7	-	Produit de départ.

Tableau 8

D'après les différents essais réalisés, pour obtenir exclusivement le produit tétra-acétylé, il faut utiliser un gros excès d'anhydride acétique : 10 éq. en présence d'acide sulfurique et 7 éq. en présence d'APTS. Dans les autres cas, on obtient un mélange de produit Tri et tétra-acétylé.

2. Réaction de Pechman:

La réaction de Pechman, décrite depuis longtemps [35], consiste en une condensation de l'acétoacétate d'éthyle (ou composés à méthylène actif) sur des composés phénoliques, pour donner, en milieu acide, une coumarine.



La réaction a été réalisée dans divers milieux acides [36], [37], [38], [39].

Pour notre part, nous avons tenté de faire réagir la purpurogalline (puisque'elle possède des OH phénoliques et énolique) avec l'acétoacétate d'éthyle, en présence d'acide sulfurique. Le mélange réactionnel a été irradié sous MO. Nous ne récupérons, à la fin de la réaction, après traitement, que de la purpurogalline.

Nous avons, alors repris la réaction en utilisant du KSF comme support et surtout comme acide. Après irradiation sous MO et traitement de la réaction, nous obtenons un nouveau produit. Le spectre RMN semble bien confirmé que c'est la coumarine attendue.

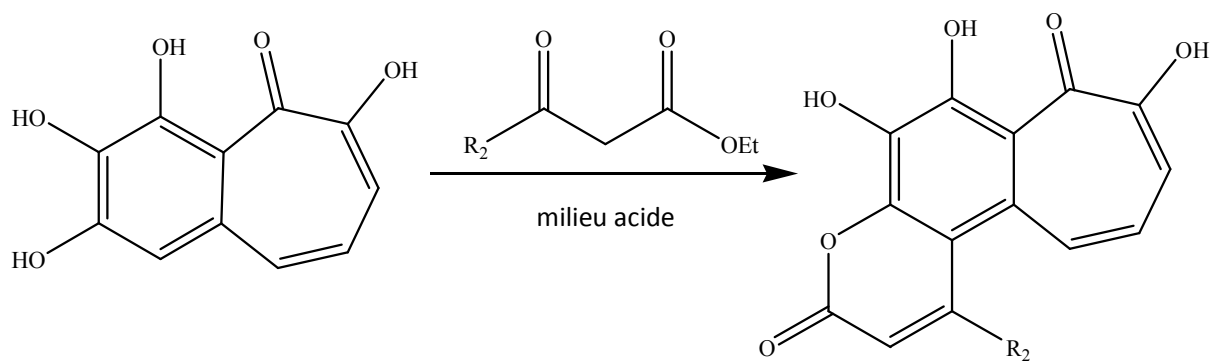
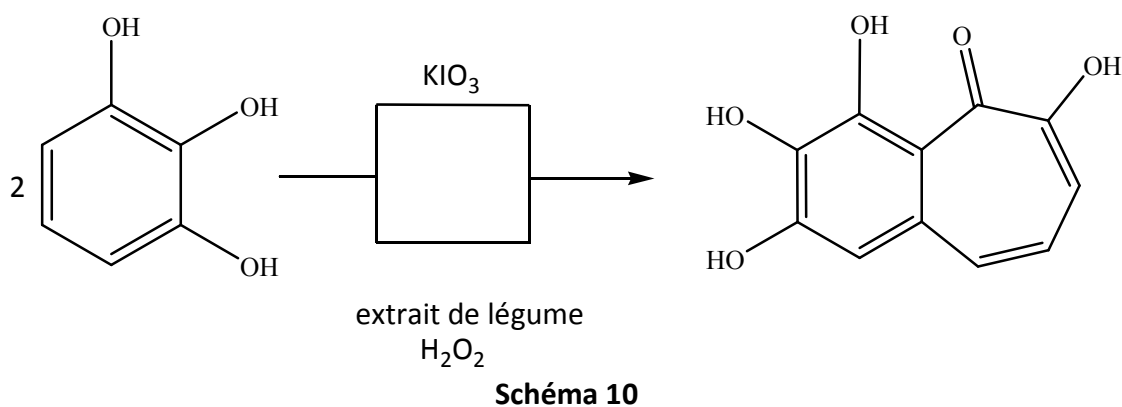


Schéma 9

D'autres essais, utilisant la purpurogalline tétra-acétylée, reste encore à tenter.

Conclusion générale

Au cours de ce travail nous avons préparé la purpurogalline par voie chimique et par voie enzymatique.



Devant la difficulté de purifier la purpurogalline obtenue par la méthode chimique, nous nous sommes réorientés vers la synthèse enzymatique en utilisant des extraits de différents légumes.

Les résultats obtenus sont variables, en fonction de la nature des légumes utilisée, ainsi qu'en fonction des paramètres (pH, concentrations, ...) que l'on a étudié.

Nous retenons, que la synthèse de la purpurogalline avec un extrait de navet (variétés locale), à une concentration de 0,6 g/ml (de matière végétale) et à un pH de 6,2, donne le meilleur résultat (rendement et pureté).

Les extraits d'ails et d'oignons semblent donner des résultats différents, qu'il serait intéressant d'exploiter.

La réactivité de la purpurogalline a été étudié à travers :

- ✓ une réaction de protection de toutes les fonctions OH.
- ✓ une réaction de Pechman (pour la synthèse d'une coumarine).

D'autres réactions sur la purpurogalline font partie de nos perspectives.

Références bibliographiques:

- [1] Harborne , JB.; *Recent advances in chemical ecology. Nat. Prod. Rep.*, **1989**, 25 , 85.
- [2] Bruneton, J.; *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 4e Ed. Éditions médicales internationales* (Tech & Doc), Paris, **2009**, 1288.
- [3] Haslam, E.; *Nat. Prod.*, **1994**, 11 , 41.
- [4] Di Carlo, G.et coll.;. *Rev. Life Sci.*, **1999**, 65 , 337.
- [5] Nijveldt , R. J.; Van Nood , E.; Van Hoorn ,D. E. C.; Boelens , P. G; Van Norren, K. et Van Leeuwen, P. A. M.; *American journal of clinical nutrition.*, **2001**, 74 , 418.
- [6] Cheng ,C.L; Guo, J.S.; Luk , J.; Koo, M.W.L.; *Life Sciences.*, **2004**, 74 , 2237.
- [7] Ames, BN; Gold ,LS; Willett ,WC.; *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.*, **1995**, 92 , 5258.
- [8] Chen, HQ; Jin, ZY; Wang ,XJ Xu XM; Deng, L; Zhao, JW.;. *Neurosci. Letters*, **2008**, 448 , 175.
- [9] Kessler , M. et coll.; *J. Pharm. Pharmacol*,**2002**, 55, 1.
- [10] Dangles, O; *The physico-chemical properties of polyphenols* (Tech & Doc). *Lavoisier*, **2006**, 17 , 64.
- [11] Pelmont, J.; *Enzymes : catalyseurs du monde vivant*. Presse Universitaire de Grenoble, **1995**, 7 , 652.
- [12] Darnell, J.; Lodish, H. ; Baltimore, D ; *Biologie moléculaire de la cellule*. De Boeck Université éd. ; **1995**.
- [13] Bergmeyer , H.U.; Gawekn, K. et al. ; *Principes de l'analyse enzymatique* (Tech & Doc), *Lavoisier*. Paris., **1979**, 17 .
- [14] Assamoi , A.A.; Destain ,J. ; Thonart , P.; *Soc. Environmental.*, **2009**, 13; 281.
- [15] Durán, N.; Esposito, E.; *Applied Catalysis B: Environmental* , **2000**, 28 , 83.
- [16] Dickschat, J. S.; Reichenbach, H.; Wagner-D'obler, I.; S. Schulz, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 4141.
- [17] Amadou, I.; Yong-Hui,S; Sun, J.; Guo-Wei, L.; *Tetrahedron letters*,**2002**, 43 ,7129.
- [18] Al-Bayati, F.; *A. Journal of Ethnopharmacology*,**2008**, 166 , 403.
- [19] Sang, S.; Tian, S.; Meng, X.; Stark, R. E.; Rosen, R. T.; Yang, C. S.; *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43 , 7129.

- [20] Jainu, M.; Srinivasulu, C.; Devi, S.; *Tetrahedron Letters*, **2006**, *104*, 156.
- [21] Windaus, J.; *Liebigs Ann. Chem.*, **1924**, *54*, 439,
- [22] Hello, C. L.; *The Alkaloids; Academic Press: San Diego*, **2000**, 53
- [23] Viveiros, M.; Amaral, L.; *J. Antimicrob. Agents*, **2001**, *17*, 225
- [24] Sugiyama, H.; Fung, K.P.; Wu, T.W.; *Life Sciences*, **1993**, *53*, 39.
- [25] Pommier, Y.; Cushman, M.; *Mol. Cancer Ther.*; **2009**, *8*, 1008.
- [26] Evans, T.W.; Dehn, W.M.; Am, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1930**, *52*, 3647.
- [27] Tauber, H.; *Proc. Sot. E'xp. Biol. and Med.*, **1952**, *81*, 237
- [28] DenisThorn, G.; Barclay, L.C.R.; *Canadian Journal of Chemistry.*, **1952**, *30*, 251.
- [29] Carey, F. A.; Sundberg, R.; *Advanced Organic Chemistry. 3rd Ed.; Plenum Press; New York*, **1993**
- [30] Hurrell, R. F.; Reddy, M.; Cook, J.D.; *J. Nutr.*, **1999**, *81*, 289.
- [31]. Hynes, M. J.; O'Coinceanainn, M.; *J. Inorg. Biochem.*; **2001**, *85*, 131.
- [32] Matsuo, Y.; Tanaka, T.; Kuono, I., *Tetrahedron Letters*, **2006**, *62*, 4774.
- [33] Rao, Y.K.; Lu, S. C.; Liu, B. L.; Tzeng, Y.M.; *J Biochem. Eng.*, **2006**, *28*, 57.
- [34] Moussouni, S.; Saru, M. L.; Ioannou, E.; Mansour, M., Detsi, A.; Roussis, V.; Kefalas, P.; *Tetrahedron Letters*, **2011**, *52*, 1165.
- [35] Pechmann, H.; Duisberg, C., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1883**, *16*, 2119.
- [36] Loh, T.P.; Feng, Li.-C.; Yang, H.Y.; Yang, J.Y.; *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 8741.
- [37] Tao, Z.F.; Qian, X. and Fan, M., *Tetrahedron Letters*, **1997**, *39*, 13329.
- [38] Frere, S.; Thiery, V.; Besson, T.; *Tetrahedron Letters*, **2001**, *42*, 2791

CHAPITRE III

Partie Expérimentale

MATERIELS ET METHODES

1- Température de fusion :

Les points de fusion (P.F) ont été mesurés sur un appareil **Bank Kofler** HEIZBANK type WME [50-260°C] et ne sont pas corrigées.

2- Chromatographie sur couche mince :

La chromatographie analytique sur couche mince (**CCM**) est faite sur plaques de gel de silice 60 F254 (Merck) (40-63 μm). Les révélateurs utilisés sont : UV (250nm) et iode.

3-Centrifugation :

La purification des solutions d'extrait de légumes se fait sur appareil **centrifugation** sigma de type 2-6P ;

4- Infrarouge:

Les spectres d'absorption dans **l'infrarouge** (IR) ont été enregistrés au moyen d'un spectrophotomètre Agilent Technologie Cary 640 FTIR. Seules les bandes caractéristiques sont mentionnées ν_{max} en cm^{-1} .

5- Résonance magnétique nucléaire :

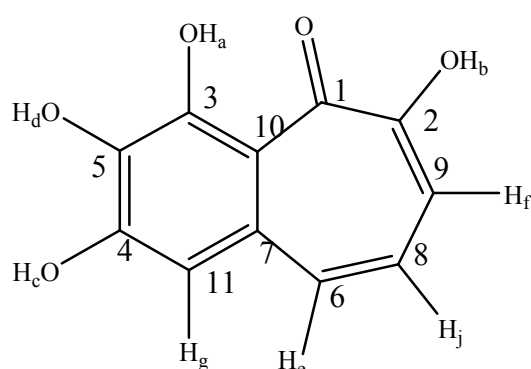
Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (**RMN ^1H**) ont été enregistrés à 400 MHz à l'aide d'un appareil Bruker AC 400.

I. Synthèse de la purpurogallin :

1) Par voie chimique :

Dans un erlenmeyer de 250 ml muni d'un barreau magnétique sont introduits : le pyrogallol (5g, 0,04mol), l'eau distillée froide 50ml et l'iodate de potassium (KIO₃) (4g, 0,018mol) par petite quantité.

Le mélange réactionnel est agité pendant une nuit, le précipité obtenu est filtré puis lavé à l'eau distillée froide. Le produit, ainsi obtenu est recristallisé dans l'acide acétique, et pour permettre une meilleure cristallisation on laisse la solution dans le congélateur durant une nuit.



C₁₁H₈O₅
 Masse molaire = 220,04 g.mol⁻¹ .
 Aspect: solide rouge brun .
 Rdt =76%.
 T_f >260°C / T_f (litt)=275°C.
 CCM R_f = 0,83 (70% acétate d'éthyle, 30%hexane).

IR ν_{max} cm⁻¹ : 3316 (OH assoc) ; 3446 (OH libre) ; 1628 (C=C arom) ; 1589 (C=O) ; 2925 (C-H arom).

RMN ¹H (DMSO) δ_H =15,23 (1H,s,OH_a) ; 10,55 (1H,s, OH_b) ; 9,40 (1H,s, OH_c) ; 9,36 (1H,s, OH_d) ; 7,32 (1H, d, H_e) ; 7,11 (1H, d, H_f) ; 6,73 (1H, s, H_g) ; 6,72 (1H, t, H_j).

RMN ¹³C (DMSO) = 182,6 (C₁) ; 155,1 (C₂) ; 152,2 (C₃) ; 151,9 (C₄) ; 135,1 (C₅) ; 134,7 (C₆) ; 133,4 (C₇) ; 124,1 (C₈) ; 116,3 (C₉) ; 115,2 (C₁₀) ; 110,68 (C₁₁).

2) Par voie enzymatique :

2-1 Par l'extrait de radis noir (HSR) :

a) Préparation de la solution d'extrait :

Le légume est découpé en petits morceaux puis mixé dans de l'eau distillée froide (5°C). Le jus ainsi obtenu est centrifugé pendant 12min, ensuite filtré .

Les solutions utilisées, sont préparées à différentes concentrations par rapport à la matière végétale. Les différentes concentrations sont résumées dans le tableau suivant :

Masse végétale g	Volume d'eau ml	Concentration g /ml
10	50	0,2
20	50	0,4
30	50	0,6

Tableau 1

b) Synthèse de la purpurogalline :

Dans un erlenmeyer de 250 ml muni d'un barreau magnétique sont introduits : le pyrogallol (1g, 0,008mol), l'eau distillée 20ml, une solution d'eau oxygénée 20 ml (0,147M) et 20 ml d'une solution d'extrait de légume par portion de 5ml, toutes les 30 min.

Le mélange réactionnel est agité pendant 12h à 16h à température ambiante, puis le précipité formé est filtré et lavé à l'eau distillée froide (5-10 °C). On récupère davantage de produit en traitant le filtrat par extraction avec un solvant organique (Chloroforme ou Acétate d'Ethyle).

Résultats :

C₁₁H₈O₅ Masse molaire = 220,04 g.mol ⁻¹ . Aspect : solide rouge-orange. T _f > 260°C. CCM R _f = 0,83 (70% acétate d'éthyle, 30%hexane).		
Rdt = 11% (0,2 g/ml)	Rdt = 14% (0,4 g/ml)	Rdt = 11% (0,6 g/ml)

2-2 par l'extrait de radis rouge :

a. Préparation de la solution d'extrait :

La préparation de l'extrait de légume est la même que précédemment (radis noir). On a utilisé les mêmes concentrations de matières végétales (0,2 g/ml ; 0,4 g/ml ; 0,6 g/ml).

b. Synthèse de la purpurogalline :

Nous avons suivi le même mode opératoire décrit précédemment.

Résultats :

C₁₁H₈O₅ Masse molaire = 220,04 g.mol ⁻¹ . Aspect : solide orangé, T _f > 260°C. CCM R _f = 0,83 (70% acétate d'éthyle, 30%hexane).		
Rdt = 11% (0,2g/ml).	Rdt = 13% (0,4g/ml).	Rdt = 11% (0,4g/ml).

2-3 par l'extrait d'oignon :

a. Préparation de la solution d'extrait :

Même méthode de préparation, mais à une concentration unique de 0,4 g/ml.

b. Synthèse de la purpurogalline :

Dans ce cas, nous avons tenté 2 types de synthèses :

1^{ère} synthèse avec l'eau oxygène :

Nous avons suivi le même mode opératoire décrit précédemment.

2^{ème} synthèse sans eau oxygénée :

Dans cette synthèse nous avons suivi les mêmes étapes décrites auparavant, sauf que l'on n'a pas ajouté d'eau oxygénée.

Résultats :

C₁₁H₈O₅ Masse molaire = 220,04 g.mol ⁻¹ Aspect : solide orangé, T _f >260°C CCM (70% acétate d'éthyle, 30%hexane) : R _f =0,83	
Rdt =14% (avec H ₂ O ₂)	Rdt =18%(sans H ₂ O ₂)

2-4 par l'extrait d'ail :

a Préparation de la solution d'extrait :

La gousse d'ail a été utilisée entièrement avec épluchage. On prépare l'extrait d'ail de la même manière que l'extrait d'oignon.

b Synthèse de la purpurogalline :

1^{ère} synthèse avec l'eau oxygène :

Nous avons suivi le même mode opératoire générale en utilisant la solution de H₂O₂.

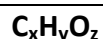
Résultats :

C₁₁H₈O₅ Masse molaire = 220,04 g.mol ⁻¹ . Aspect : solide orangé. T _f >260°C. CCM (70% acétate d'éthyle, 30%hexane) : R _f =0,83 . Rdt = 30%.
--

2^{ème} synthèse sans eau oxygénée :

Dans ce cas, la solution d'eau oxygénée n'est pas ajouter ; l'oxydation se fait exclusivement avec l'oxygène de l'air. Nous n'obtenons pas la purpurogalline, mais un autre produit d'oxydation qui doit être identifié.

Résultats :



Masse molaire = ??? g.mol⁻¹.

Aspect : solide vert.

T_f > 260°C.

CCM (70% acétate d'éthyle, 30%hexane) : R_f=0,55.

Rdt = 48%.

Le produit formé n'est à priori pas de la purpurogalline (solide vert et R_f différent), cependant on doit pousser davantage les analyses pour être identifier.

IR v_{max} cm⁻¹: 3316(OH); 1637(C=C arom); 1519(C=C arom); 2925(C-H arom).

2-5 par l'extrait de navet (« navet arabe ») :

Une étude systématique, tenant compte de différents paramètres, a été réalisée pour ce légume, afin d'optimiser les rendements.

- ✓ Concentration en extrait de légumes (variation de la masse de la matière végétale)
- ✓ Temps et fréquence d'introduction de l'extrait de légume et de la solution de H₂O₂
- ✓ pH de la solution d'extrait de légume.

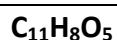
Les mêmes modes opératoires pour la préparation des extraits de légume et la synthèse de la purpurogalline ont été adoptés.

a) Variation de la concentration d'extrait de Navet :

Les mêmes étapes de préparation des extraits de navet ont été utilisées. Les solutions sont utilisées au pH de l'eau distillé.

La synthèse de la purpurogalline a été effectuée en mettant en contact pendant 18h, à température ambiante, le pyrogallol (1g, 0,008mol) dissout dans 20 ml d'eau distillée, la solution d'eau oxygénée (20 ml ; 0,147M) et les différentes concentrations d'extrait de navet. Le précipité obtenu est filtré et lavé à l'eau distillée froide. Nous obtenons pour chaque cas la purpurogalline sous forme solide avec des rendements variable.

Résultats:



Masse molaire = 220,04 g.mol⁻¹.

Aspect : solide orangé, T_f > 260°C.

CCM (70% acétate d'éthyle, 30%hexane) : R_f=0,83.

Masse végétale g	Volume d'eau ml	Concentration g /ml	Rdt %
10	50	0,2	11
15	50	0,3	15
20	50	0,4	25
25	50	0,5	25
30	50	0,6	11

Tableau 2

b) Variation du temps et de la fréquence d'introduction des solutions d'extrait de navet et d'H₂O₂

Dans un erlenmeyer, muni d'un barreau magnétique ont dissout le pyrogallol (1g, 0,008 mol) dans 20 ml d'eau distillée. On ajoute les solutions d'H₂O₂ (0,147 M) et d'extrait de navet (0,4 g/ml) :

- ✓ Méthode 1 : toutes les 2 heures pendant 6 heures (3 x 20 ml d'H₂O₂ + 3 x 20 ml d'extrait de navet).
- ✓ Méthode 2 : toutes les heures pendant 6 heures (6 x 10 ml d'H₂O₂ + 6 x 10 ml d'extrait de navet).
- ✓ Méthode 3 : toutes les 30 minutes pendant 6 heures (12 x 5 ml d'H₂O₂ + 12 x 5 ml d'extrait de navet).

Nous obtenons le même produit : la purpurogalline avec les mêmes caractéristiques et des rendements variables :

Résultats :

Méthode 1	Rdt = 36 %
Méthode 2	Rdt = 34 %
Méthode 3	Rdt = 25 %

Tableau 3

a. Variation du pH de la solution d'extrait de navet :

- ✓ Préparation des solutions tampon :

En fonction des intervalles de pH, les solutions tampon sont préparées en utilisant une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 N et une solution de citrate à 0,1N.

pH	Solution de HCl (0,1 N) ml	Solution de citrate (0,1 N) ml
2,6	6	4
3,36	5,25	4,75
4,15	4	6

Tableau 4

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE

Ou une solution de KH_2PO_4 (9,078 g/l) et une solution de Na_2HPO_4 (11,875 g/l).

pH	Solution de KH_2PO_4 (9,078 g/l)	Solution de Na_2HPO_4 (11,875 g/l)
5,57	0,25 ml	9,75 ml
6,21	0,5 ml	9,5 ml
6,97	2 ml	8 ml
7,73	7 ml	3 ml
8,36	9,5 ml	0,5 ml

Tableau 5

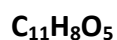
Les extraits de légume sont préparés dans ces solutions tampon avec une concentration 0,4g/ml (20g dans 50ml de solution tampon).

✓ Synthèse de la purpurogalline :

La synthèse de la purpurogalline a été réalisée selon la méthode 1 décrite dans le paragraphe précédent 2.5 b).

Nous obtenons le même produit : la purpurogalline avec les mêmes caractéristiques et des rendements variables en fonction du pH.

Résultats :



Masse molaire = 220,04 g.mol⁻¹.

Aspect : solide orangé, $T_f > 260^\circ\text{C}$.

CCM (70% acétate d'éthyle, 30%hexane) : $R_f = 0,83$.

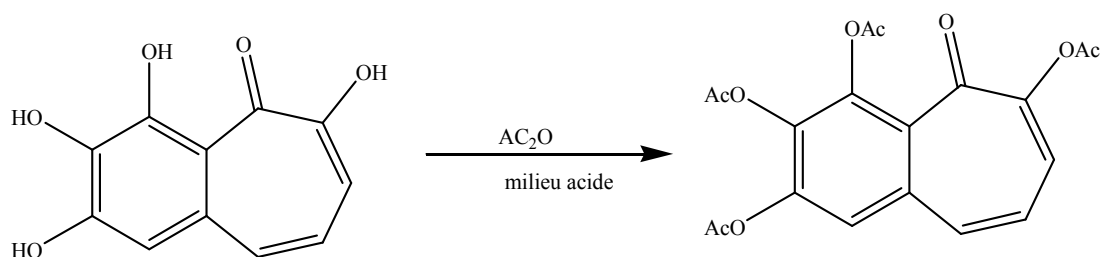
pH	2,6	3,36	4,15	5,57	6,21	6,97	7,7	8,36
Rdt %	20	24	26	49	78	54	52	39

Tableau 6

II. Réactivité de la purpurogalline :

1- protection du groupement OH :

Nous avons protégé les groupements OH de la purpurogalline par d'anhydride acétique en milieu acide.



➤ **Méthode 1 :**

Mode opératoire générale :

Dans un ballon Bicol de 200 ml muni d'un barreau magnétique, d'un réfrigérant et d'un thermomètre sont introduits la purpurogalline (4g, 0,018mol), l'anhydride acétique (5éq., 7éq. et 10éq.) et une quantité catalytique d'acide (H_2SO_4 à 96%, APTS ou AcOH).

Le mélange réactionnel est chauffé à 70-80°C pendant 1 h 30 min.

Après avoir refroidit le ballon, on ajoute 70ml d'eau froide ; il y a formation d'un précipité que l'on filtre et que l'on lave à l'éther. Le produit est obtenu sous forme de solide vert.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Nature de l'acide	Nombre d'éq d' Ac ₂ O	Rdt %	Pureté (R _f)	T _f °C	T _f °C
H ₂ SO ₄ conc.	5	-	trois tâches	-	-
H ₂ SO ₄ conc	7	-	trois tâches	-	-
H ₂ SO ₄ conc.	10	48,5%	Mono tâche (0,75)	186-190	187
APTS	7	49,5 %	Mono tâche (0,77)	182-186	187
AcOH (7 éq)	7	-	Produit de départ	-	-

Tableau 7

IR $v_{max} cm^{-1}$:1770(C=O Ac) ; 1630(C=O trop) ; 1480(C=C arom) ; 2934(C-H arom).

2- Réaction de pechman :

✓ **Méthode 1 :**

Dans un erlenmeyer de 50ml sont introduits la purpurogalline (0,97g), l'acétate d'éthyle (4ml) et l'acide sulfurique concentré (0,14ml). Le mélange est irradié au M.O pendant 10 min selon des paliers de 10 à 15 secondes.

Le solide obtenu est filtré et ensuite lavé avec de l'éthanol.

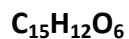
La CCM révèle plusieurs tâches. Produit impure.

✓ Méthode 2 :

Dans un creuset, sont malaxés, la purpurogalline (0,42g), l'acéto acétate d'éthyle (3ml) dans le KSF (bentonite). Le mélange est irradié au M.O selon des paliers de 05 à 10 secondes pendant 10 minutes.

Le produit obtenu sous forme de solide, est lavé avec l'éthanol. La CCM révèle un produit mono tâche.

Résultats :



Masse molaire = 288,25 g.mol⁻¹.

Aspect : solide, T_f > 260°C.

Rdt = 40%.

CCM (70% acétate d'éthyle, 30%hexane) : R_f = 0,75.

IR ν_{max} cm⁻¹ = 3447 (OH libre) ; 3305 (OH assoc) ; 1715 (C=O ester) ; 1625 (C=O) ;
1378 (C-O ester) ; 1587 (C=C).

RMN ¹H (CDCl₃) δ_{H} = 15.34 (1H, s, OH) ; 10.60 (1H, s, OH) ; 9.42 (1H, s, OH)
7.37 (1H, s, CH-C=O) ; 7.1 (1H, m, CH=C) ; 6.92(1H, m, CH=C) ; 6.76(1H, m, CH=C) ;
1.25 (3H, s, CH₃).

ANNEXE

