

Licence Sciences et Techniques (LST)
Technique d'Analyse et Contrôle de Qualité
« TACQ »

PROJET DE FIN D'ETUDES

**Dosage des polyphénols dans les eaux
Usées.**

Présenté par :

EI MASTOURI MOHAMED

Encadré par :

- ◆ Mr FARHAT KAMAL (Qee)
- ◆ Pr EL ASRI MOHAMMED (FST)

Soutenu Le 07 Juin 2018 devant le jury composé de :

- Pr EL ASRI Mohammed
- Pr BOULAHNA Ahmed
- Pr EL GHAZOUALI Ahmed

Stage effectué à QEE

Année Universitaire 2017 / 2018

REMERCIEMENT

Avant tout développement sur cette expérience professionnelle, il apparaît opportun de commencer ce rapport de stage par des remerciements, à ceux qui nous ont beaucoup aidé au cours de ce stage, et même à ceux qui ont eu la gentillesse de faire de ce stage un moment très profitable.

- Mes remerciements vont à Monsieur le directeur de laboratoire Qualité Eau Environnement **FARHAT KAMAL** de m'avoir accepté au sein de son laboratoire pour effectuer ce stage pour ses pertinentes observations et remarques qui ont permis l'amélioration de ce travail.
- Je remercie Mme LOUKILI Sanae, pour ses informations qui m'ont aidées à avoir les notions du laboratoire.
- J'ai l'immense plaisir d'exprimer ma profonde gratitude à l'égard de mon encadrant de l'FST, Monsieur EL-ASRI Mohammed, pour qui j'éprouve une véritable admiration en tant que personne très sérieux qu'enseignant chevronné, je suis reconnaissant pour lui d'avoir bien voulu encadrer ce stage, pour tout le temps qu'il m'a consacré, pour ses conseils pertinents et ses directives précieuses. J'espère avoir été à la hauteur de sa confiance.
- Mes remerciements vont également à messieurs les membres de jury : pr Ahmed BOULHNA et Ahmed EL GHAZOUALI.
- Je remercie aussi mes chers enseignants de la filière TACQ et tout l'ensemble du corps professoral pour leurs efforts en vue d'assurer une formation de haut niveau pour l'ensemble des étudiants.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
1. Présentation du laboratoire QEE	2
1.1. Description	2
1.2. Domaine d'activité.....	2
1.3. Activités principales	2
1.4. Organigramme du laboratoire QEE.....	3
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. Généralité sur les composées phénoliques	5
1.1. Définition des polyphénols.....	5
➤ Les sources de polyphénols.....	5
1.2. Classification des composés phénoliques.....	5
1.2.1. Les acides phénols.	5
1.2.2. Flavonoïdes	6
1.2.3. Les Tanins	6
1.3. L'impact des polyphénols.	7
1.3.1. Les avantages	7
1.3.2. Les impacts sur l'environnement	8
1.4. Propriétés générales des polyphénols.	8
1.4.1. La solubilité	8
1.4.2. Propriétés antioxydants	8
2. Les techniques d'analyse des polyphénols	9
2.1. Méthode de Folin Ciocalteu.....	9
2.1.1. Définition	9
2.1.2. Le Domaine d'application FC.	10
2.2. Méthode de Folin Dennis.	10
2.2.1. Définition	10
2.2.2. La différence entre la méthode de FD et la méthode de F C :.....	10
2.3. Méthode de Zhishen AL CL3 (flavonoïdes)	11
PARTIE EXPERIMENTALE	12
1. Préparation des échantillons pour l'analyse.....	13

1.1.	Prélèvement et conservation	13
1.2.	Mesure de pH et la conductivité	13
1.3.	Filtration	15
2.	Dosage des polyphénols par la Méthode de Folin Ciocalteu.	16
2.1.	Appareillage	16
2.2.	Spectrophotométrie UV	16
2.3.	Mode opératoire	17
2.3.1.	Etablissement de la courbe d'étalonnage.	18
2.3.2.	Protocole expérimental des échantillons (filtres).	21
2.	Résultats et discussion.	23

INTRODUCTION

Dans les eaux usées de la ville Fès, les polyphénols proviennent principalement des centres pharmaceutiques, des zones industrielles ainsi que des déchets domestiques. Les eaux chlorées, en présence de phénols, ont un goût désagréable dû à la formation de chloro-phénols. Ce goût est décelé même en présence de quelques microgrammes par litre de phénols.

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux et appartenant à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales.

Parmi les méthodes de quantification des composés phénoliques, nous utilisons dans notre laboratoire préférentiellement un protocole utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Il s'agit d'une méthode analytique biochimique nécessitant la prise d'échantillons, la séparation des composés phénoliques à partir de ces échantillons bruts puis d'une mesure spectrophotométrique des extraits, Mais il y'a des facteurs influençant l'analyse des polyphénols comme la présence des interférences, Il y'a aussi d'autres méthodes de quantification des composés phénoliques comme le réactif de Folin Dennis qui nécessite la centrifugation des échantillons.

-La première partie de ce rapport présente un rappel bibliographique sur les composés phénoliques, leurs propriétés et les techniques d'analyse utilisées

-La seconde partie sera consacré à l'étude expérimentale, Dans le cadre de ce travail on s'est intéressé à l'analyse des composés phénoliques dans les eaux usées ; L'analyse de polyphénols par la méthode de Folin – Ciocalteu et l'effet de la dilution sur la concentration finale des polyphénols.

1. Présentation du laboratoire QEE

1.1. Description

Le laboratoire Qualité- Eau- Environnement (Q.E.E) est une société à responsabilité limitée créée en 2008. Situé à HAY LALA SOUKAYNA ZOUAGHA – FES, il propose de large gamme de présentations analytiques, de conseils, d'expertises et de formation dans la chimie et de la microbiologie des eaux : naturelles, potables, industrielles et usées.

La partie administrative comporte une direction, un service secrétariat et service comptabilité, La partie réservée au Laboratoire comporte plusieurs salles de : microbiologie,

1.2. Domaine d'activité

Le laboratoire qualité Eau Environnement dénommée QEE réalise le prélèvement et les analyses physico-chimiques et microbiologiques des différents types d'eaux et d'aliments

1.3. Activités principales

Le laboratoire QEE, propose ses services dans les domaines suivant :

Prélèvements :

- Prélèvement des eaux : eau de robinet, eau de surface, eau profondes et eaux résiduaires,
- Prélèvement des aliments.

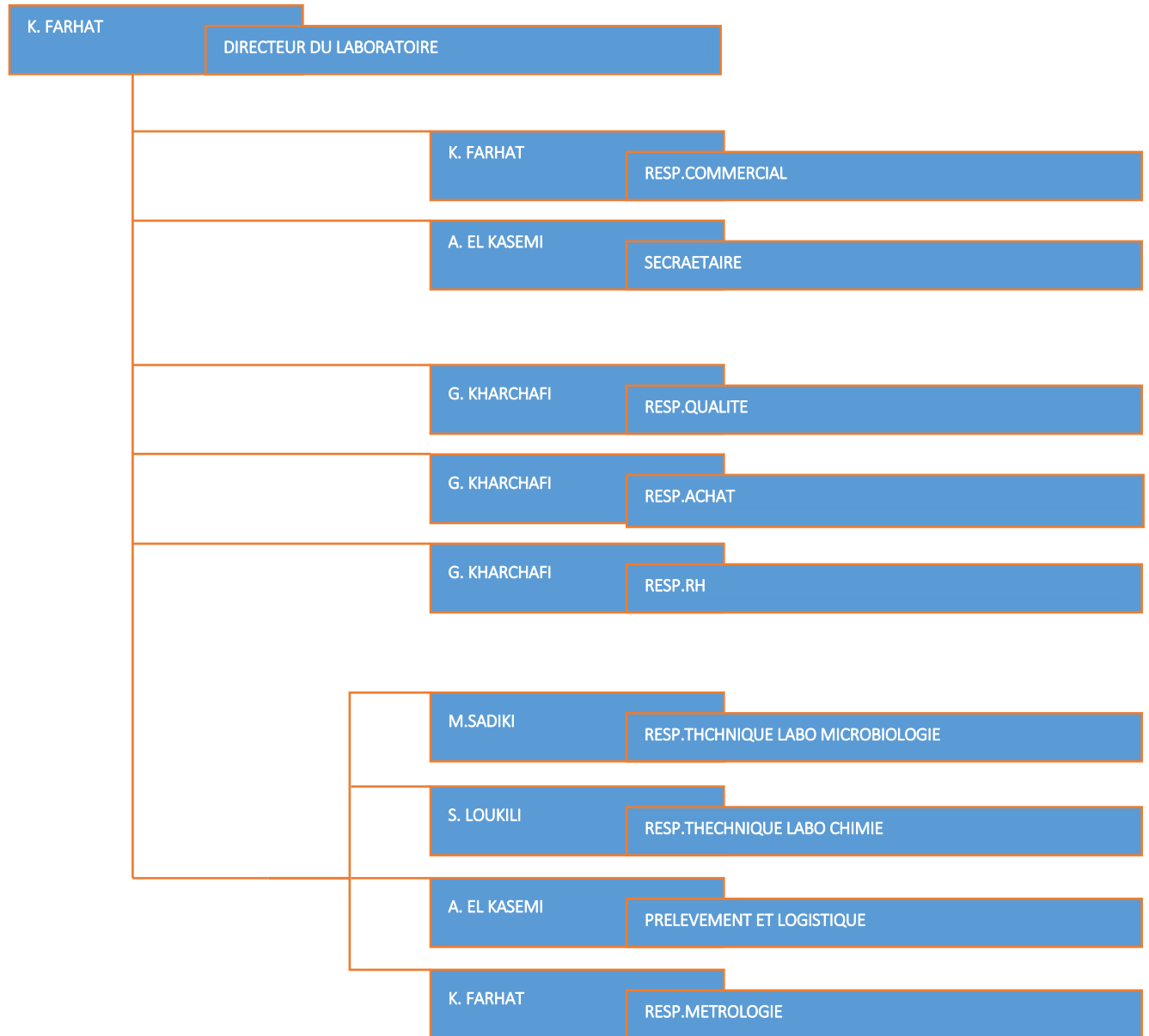
Le laboratoire réalise des prélèvements ponctuels en continu 24h sur 24h à l'aide des automates programmables afin d'obtenir une présentation moyenne des variations des phénomènes de pollution. Ce dispositif est souvent utilisé pour le prélèvement des effluents industriels et urbains.

Mesure de débit des rejets liquides,

Analyses chimiques, physico-chimiques et microbiologiques des eaux : d'alimentation, résiduaire

Réalisation des analyses qui consistent à vérifier la conformité des produits alimentaires à des critères bactériologiques et physico-chimiques.

1.4. Organigramme du laboratoire QEE



PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralité sur les composées phénoliques

1.1. Définition des polyphénols.

Les polyphénols sont synthétisées par les végétaux, ils sont comme l'indique le nom par la présence d'au moins deux groupe phénolique associées en structure plus au moins complexe.

Les polyphénols naturels regroupent donc un ensemble de structures chimique comprenant au moins un noyau aromatique portant un au plusieurs groupe hydroxyle.

➤ Les sources de polyphénols.

Les polyphénols sont plus particulièrement présents dans les fruits, les fraises, mais aussi les fruits rouges, orangés et jaunes. A chaque couleur de fruit correspond un type de polyphénols. D'autres aliments et boissons sont des sources de polyphénols : thé, cacao et vin [1].

1.2. Classification des composés phénoliques

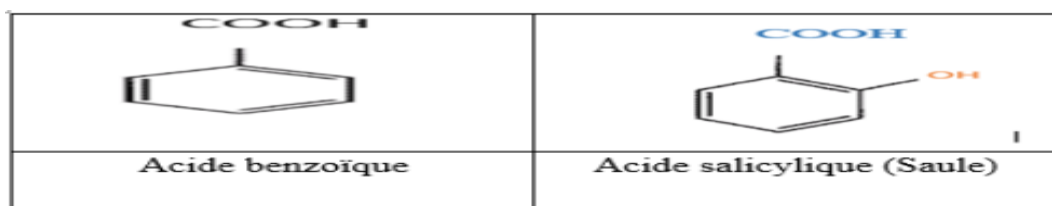
On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes de carbone et d'autre part, sur la structure de squelette de base.

1.2.1. Les acides phénols.

Ce sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque (C6-C1) ou de l'acide cinnamique (C6-C3) [2].

1.2.1.1. Acides phénols dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1)

Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, se sont des composés possédant un squelette de base à sept atomes de carbone, constitués d'un noyau aromatique caractérisé par la présence d'un acide peut être substitué par un groupement alcool au plus.



Types des acides benzoïques.

1.2.1.2. Acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3)

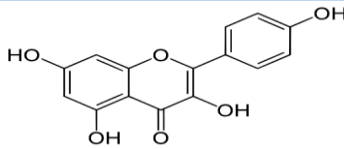
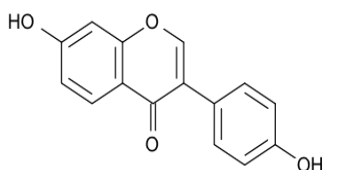
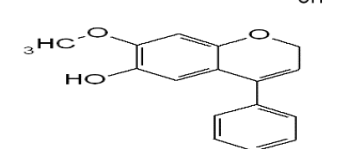
Ils présentent une distribution très large dans le règne végétal, le plus souvent estérifiés. se sont des composées possédant un squelette de bas à 9 atomes de carbone, constitués d'un noyau aromatique substitué pare 3 carbone et caractérisé par la présence d'un acide.



Fig (2) : types des acides cinnamiques [2]

1.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6 [3].

<u>Les différentes classes des polyphénols</u>				
Squelette carboné	Classe	Exemple	Structure	Origine
C6-C3-C6	Flavonoïdes lato sensu	Kaempférol		Fraises
	Iso flavonoïdes	Daidzéine		Graines des soja
	Anthocyanes	Dalphoniol		Fruits rouges

(Tableau (1) : différentes classes des flavonoïdes)

1.2.3. Les Tanins

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles, Historiquement, le terme « tanin » regroupe des composés poly phénoliques

caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines. Les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés [4] :

- **Tanins hydrolysables** : ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide gallique (Fig. 3), Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase).

- **Tannins condensés** : les tanins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (Fig. 4).

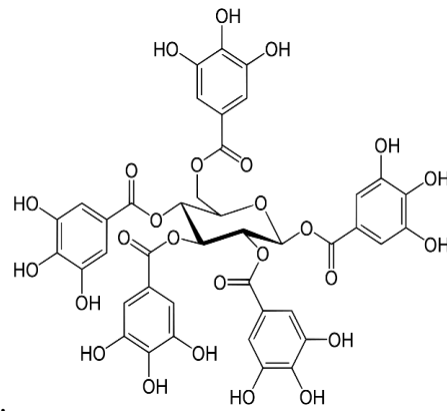
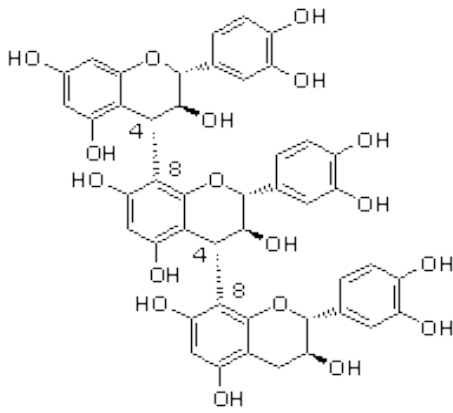


Figure (4) : polymère de tanins condensés.

Figure (3) : esters D-glucose et de l'acide gallique

1.3. L'impact des polyphénols.

1.3.1. Les avantages

Les polyphénols permettent de lutter :

- ✓ Lutter contre la prolifération anarchique des cellules.
- ✓ Prévenir les maladies cardiovasculaires. Les polyphénols pris lors d'un repas permettraient de lutter contre l'oxydation du mauvais cholestérol. Cela empêcherait ainsi les phénomènes à l'origine de l'obstruction des artères.
- ✓ Prévenir et traiter les maladies inflammatoires. Encore faut-il dans ce cas éliminer les causes de l'inflammation et notamment les aliments pro inflammatoires (graisses saturés, excès de sucre etc.). [1]

1.3.2. Les impacts sur l'environnement

Quand ils sont anormalement disséminés dans l'environnement, les phénols sont des polluants de l'air, du sol ou de l'eau.

L'infiltration d'une faible quantité des composés phénoliques est capable de rendre les eaux souterraines toxiques. Les composés phénoliques s'oxydent facilement par l'oxygène du milieu en subissant ainsi une ionisation, ce qui rend le milieu irrespirable.

Certains phénols ont des fonctions biologiques importantes (défense biochimique contre les microbes et champignons chez les végétaux notamment) chez certaines espèces, mais ils sont toxiques, voire hautement toxiques pour l'homme et d'autres espèces.

1.4. Propriétés générales des polyphénols.

1.4.1. La solubilité

Les phénols libres sont solubles dans les solvants organiques polaires (alcool, cétone, éther), les solutions d'hydroxyde de Na et de carbonate de Na

- ✓ Les hétérosides sont solubles dans l'eau.

Les phénols sont des composés instables :

- ✓ Oxydation surtout en milieu alcalin
- ✓ Isomérisation sous l'action des UV

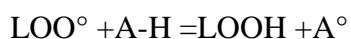
1.4.2. Propriétés antioxydants

La plus importante cause du vieillissement des produits alimentaires et cosmétiques est l'oxydation. Ces dégradations ont un effet sur les qualités nutritionnelles et sensorielles des aliments et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur, car elles sont actives de la même manière sur les tissus biologiques.

Les principaux agents oxydants sont les espèces réactives de l'oxygène (O_2^- , IO_2 , HO° , H_2O_2 , NO°), des enzymes (lipoxygénases, peroxydases), des ions métalliques (Cu., Fer) et les peroxydes lipides qui contribuent à la formation de chaînes de radicaux libres. Ces agents attaquent les protéines, les acides nucléiques, les acides gras insaturés et les vitamines entre autres.

On compte au moins cinq modes d'intervention des antioxydants : interruption de la chaîne de propagation des réactions radicalaires par chélation des métaux de transition, désactivation des espèces oxygénées réactives, inhibition de l'activité des enzymes de peroxydation, abaissement de la pression partielle de l'oxygène.

Les polyphénols étant des molécules à plusieurs noyaux benzénique, cette particularité confère à la fonction phénol un caractère plus acide que les groupements alcool : elle cède donc facilement un proton H⁺ pour former l'ion phénoxy. La perte d'un hydrogène : proton+électron conduit à la formation d'un radical fortement stabilisé. C'est cette propriété chimique qui donne aux composés phénoliques leur caractère antioxydant. En perdant un hydrogène au profit des lipides LOO[°], ils les stabilisent sous forme d'hydroperoxydes LOOH et inhibent les réactions de propagation de la chaîne d'oxydation. C'est ce mécanisme qui définit les antiradicalaires [5]



2. Les techniques d'analyse des polyphénols

2.1. Méthode de Folin Ciocalteu

2.1.1. Définition

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phospho-tungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phospho-molybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

Cette méthode s'applique à la détermination des phénols totaux dans les eaux souterraines

Ce dosage non spécifique s'effectue à partir des extraits aqueux. Le réactif de Folin-Ciocalteu voit ces propriétés colorimétriques modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules. Il réagit avec la fonction –OH des polyphénols [6]. Cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleu foncé, qui passe une absorption maximale aux environs des 725nm permettant de déterminer la concentration des polyphénols en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues.

Les phénols sont estimés par une spectroscopie UV dont l'acide gallique est utilisé comme un standard à une longueur d'onde $\lambda = 750 \text{ nm}$.

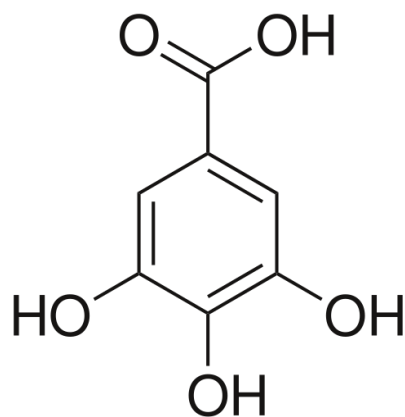


Figure (5) : l'acide gallique

2.1.2. Le Domaine d'application FC.

Cette méthode s'applique à la détermination des phénols totaux dans les eaux souterraines, les eaux de surface, l'eau potable et les eaux usées. Les poly-phénols sont exprimés en milligrammes (mg) d'acide gallique (mg/l). Par litre d'échantillon.

2.2. Méthode de Folin Dennis.

2.2.1. Définition

Est basée sur l'oxydation des cycles phénoliques, couplée à la réduction d'acide phosphomolybdique. Les méthodes Folin Denis et Folin Ciocalteu sont largement utilisées déterminer la teneur totale en polyphénols dans plusieurs types d'échantillons. Cependant, il y a plusieurs variations de ces méthodes telles que le temps de réaction, le volume de réactif et la dilution de l'échantillon. Donc, Il est important de revoir ces paramètres avant d'appliquer la méthode analytique de choix [7].

2.2.2. La différence entre la méthode de FD et la méthode de F C :

La méthode de FD est différée de celle de Folin-Ciocalteu par la présence du lithium sulfate, permettant de diminuer la formation de précipité, facilitant la lecture de l'absorbance, est ajouté au réactif de Folin-Denis. De plus, la méthode utilisée ici ne nécessite pas de centrifugation et est plus rapide.

2.3. Méthode de Zhishen AL CL3 (flavonoïdes)

La quantification des flavonoïdes a été effectuée avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbe dans le visible à 510 nm. Le flavonoïde standard utilisé dans cette méthode est la catéchine (Mohamed, 2006) [8].

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Préparation des échantillons pour l'analyse.

1.1. Prélèvement et conservation

On prélève 1 litre d'échantillon représentatif dans une bouteille. On conserve l'échantillon à environ 4 °C.

La préparation des échantillons est d'une importance principale pour toute analyse fiable. De nombreuses méthodes de préparation des échantillons ont été développées pour déterminer les composés phénoliques.

On effectue ce travail sur 4 échantillons différents.

1.2. Mesure de pH et la conductivité.

a) pH

La mesure de pH se fait par la méthode POTENTIOMETRIQUE

- PRINCIPE

La mesure de pH se fait avec le pH – mètre doté d'une électrode de verre, avec

$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$

- MODE OPERATOIRE

- Etalonnage de l'appareil
- Rinçage de l'électrode par Eau distillée
- On met de l'électrode dans un bécher qui contient de l'échantillon à analyser
- L'appareil donne directement la valeur du pH

b) Conductivité

- PRINCIPE

La mesure de conductivité se fait avec le conductimètre, pour vérifier si l'eau de conduit ou non l'électricité.

- MODE OPERATOIRE

- Etalonnage de l'appareil
- Rinçage de la cellule par Eau distillée
- On met de la cellule dans un bécher qui contient de l'échantillon à analyser
- L'appareil donne directement la valeur de la conductivité par ms ou μ

Description des échantillons :

- **Echantillon (A) : Eaux usées industrielles.**

Eaux qui sont rejetées au cours de processus de production industrielle et qui n'ont pas de valeur immédiate pour ces processus.

- L'échantillon(A) à une couleur bleue, et sa valeur de pH= 6.74mesuré à l'aide d'un pH mètre
- la conductivité est égal $\Omega=2.85\text{ms/cm}$ mesuré par le conductimètre.

- **Echantillon (B) : Eaux usées domestiques.**

Ce sont les eaux de la cuisine, de la salle de bain, des toilettes ...etc. Elles sont particulièrement porteuses de pollution organique, composées de graisses, détergents, solvants, déchets organiques azotés ou encore de différents germes.

- L'échantillon (B) a une couleur brune et sa valeur de pH=6.62
- La conductivité de l'Ech(B) : $\Omega=2.21\text{ms/cm}$

- **Echantillon (C) : Eaux usées des tanneries.**

Ce sont les eaux de la tannerie où le tannage dans laquelle on traitées chimiquement et mécaniquement les peaux d'animaux (bœuf, mouton, chèvre, cochon) pour la production de cuir.

- Echantillon(C) a une couleur brune et sa valeur de pH =7.24
- La conductivité de l'Ech : $\Omega=18.86\text{ms/cm}$

- **Echantillon (D) : Eaux usées des margines.**

Les eaux usées des margines provienne principalement à des moulins d'olive.

- l'échantillon (D) à un couleur noir, et sa valeur de pH =6.02
- la conductivité de l'Ech : $\Omega=2.20\text{ms/cm}$.

Source des polyphénols dans chaque échantillon.

- Les polyphénols dans les eaux usées industrielles proviennent principalement à des produits chimiques utilisée, au cours des processus de fabrication et les eaux usées domestiques contiennent aussi les polyphénols qui émaner à des produits de lavage et le reste des déchets végétales soluble dans l'eau.
 - Les polyphénols présentent dans les eaux usées de l'Ech (C) issus à la fabrication de cuire car le processus de tannage consiste a traité la peau par les tannins végétaux pour obtenir le cuire et les produits utilisés finissent ainsi dans les eaux usées des tanneries.
 - Les composés phénoliques d'Ech (D) sont très divers, ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction.
- ❖ Pour éliminer les particules en suspension et diminue l'intensité de la couleur, on doit faire la filtration des échantillons pour effectuer l'analyse quantitative en spectrophotomètre.

1.3. Filtration

La filtration des eaux usées est nécessaire pour certaines analyses en laboratoire, elle permet de supprimer les particules en suspension dans l'eau.

-La filtration des échantillons (A, B, C, D) est effectué à une épaisseur de 0.45 μm et à l'aide d'une pompe de filtration on récupère 100ml de chaque échantillon.

Le but de la filtration est de sépare les constituants liquide-solide pare passage à travers un milieu filtrant.



Figure (6) : filtration sous vide des échantillons à l'aide d'une pompe.

2. Dosage des polyphénols par la Méthode de Folin Ciocalteu.

2.1. Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

- ✓ Bicher de 50 ml.
- ✓ Spectrophotomètre permettant de travailler à 750 nm.

2.2. Spectrophotométrie UV

✓ Définition.

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert. La densité optique des solutions est déterminée par un

spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier.

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est

Absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 .



Figure (7) : spectrophotomètre UV-Vis

✓ Principe.

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance A à la longueur d'onde étudiée.

2.3. Mode opératoire

✚ Préparation des réactifs.

➤ Préparation des solutions étalonnées diluées d'acide gallique pour la préparation de la courbe d'étalonnage.

- ❖ Solution mère étalonne à 1000mg /l d'AG
 - Acide gallique poudre :0.1g
 - Eau distillée : 100ml

❖ Solution fille étalonne à 100mg/l d'AG (**solution fille S1**)

-solution mère 1000mg/l :10ml

- Eau distillé 100ml

❖ Solution fille étalonne 10mg/l d'AG (**solution fille S2**)

-solution fille 100mg/l :10ml

-Eau distillé 100ml

➤ Préparation du solution Na_2CO_3 à 20%

-20g de Na_2CO_3 poudre

-100ml d'eau distillée.

➤ Réactifs de FC

Ce réactif est disponible dans le commerce prêt à l'emploi. Il peut être préparé de la façon suivante :

- 100 g de tungstate de sodium
- 25 g de molybdate de sodium sont dissous dans 700 ml d'eau distillée ;
- Ajouter 50 ml d'acide phosphorique à 85% ($\rho_{20} = 1,71 \text{ g/ml}$),
- 100 ml d'acide chlorhydrique concentré ($\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$).
- Porter à ébullition sous reflux durant 10 heures,
- Ajouter ensuite 150 g de sulfate de lithium, quelques gouttes de brome et porter à nouveau à ébullition durant 15 min.
- Refroidir et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée

2.3.1. Etablissement de la courbe d'étalonnage.

Avant la lecture spectrophotométrique des échantillons on doit faire une gamme d'étalonnage et on utilise l'acide gallique comme standard à une longueur d'onde $\lambda=750\text{nm}$.

Dans une série de béchers de 50 ml on prépare une série de dilution à partir d'une solution d'acide gallique à 10mg/l de manière à avoir les concentrations suivantes :1/2/3/4/5/6/ mg/l.

N° béchers	B	I	II	III	IV	V	VI
L'eau distillé (ml)	25	22.5	20	17.5	15	12.5	10
Solution étalonne d'acide gallique 10mg/l (ml)	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15
Réactif de Foilin -Ciocalteau (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Carbonates de Sodium en (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Correspondance En acide gallique mg/l	0	1	2	3	4	5	6

Tableau (2) : protocole expérimental des solutions étalonne.

- ❖ Complète le volume à 25 ml dans chaque bécher par de l'eau distillée et homogénéiser
- ❖ Ajoute dans l'ordre et sans attendre entre chaque ajoute
- ❖ 0.5ml de RFC
- ❖ 2ml de carbonates de sodium à 20%
- ❖ Placer les échantillons préparés dans l'obscurité pendant 30 min pour stabiliser la réaction.
- ❖ Effectuer les lectures au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm.

➤ **Linéarité**

Les résultats de la variation de l'absorbance en fonction de la concentration d'acide gallique en (mg/l) sont regroupés dans le tableau (3).

Tableau (3) : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration d'acide gallique à une longueur d'onde de 750nm.

Paramètres	B	I	II	III	IV	V	VI
Absorbance	0.00	0.0618	0.1271	0.1909	0.2495	0.3265	0.3809
Concentration mg/L	0.00	1mg/l	2mg/l	3mg/l	4mg/l	5mg/l	6mg/l

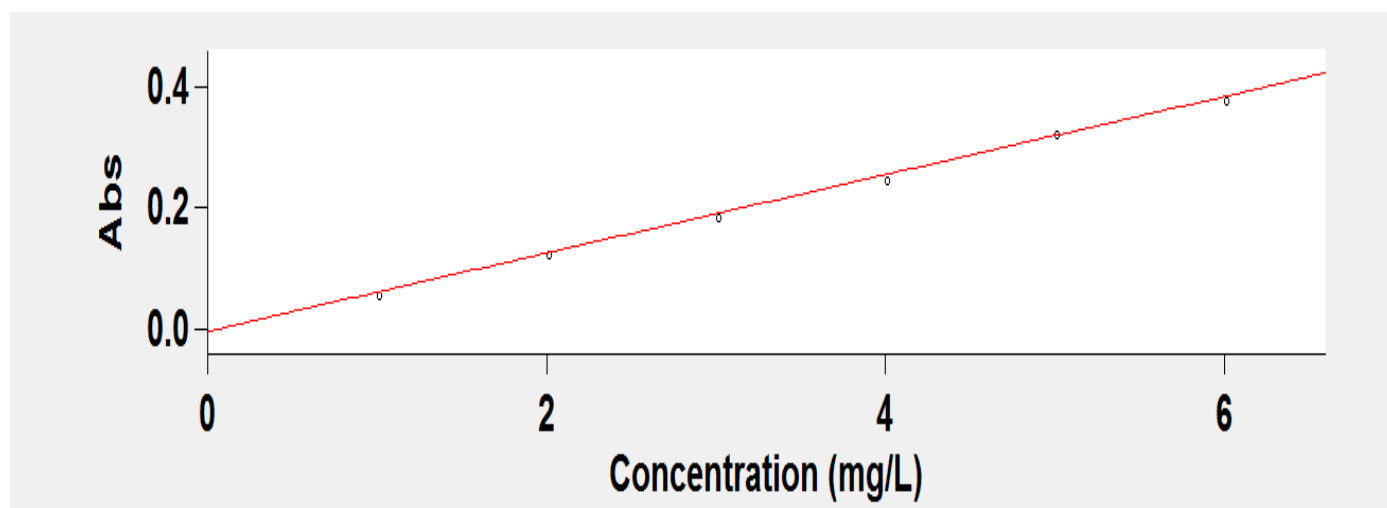


Figure (8) : Courbe d'étalonnage d'acide gallique. Absorbance en fonction de la Concentration (mg/l).

$R^2=0.998$

$Y=0.06435C-0.00245$

2.3.2. Protocole expérimental des échantillons (filtres).

- Nous avons fait la première dilution des échantillons filtrés pour éviter les valeurs hors gamme d'étalonnage et pour diminuer les valeurs d'absorbances résiduelles avant l'ajout des réactifs.

Les facteurs des dilutions sont choisis selon l'intensité de la couleur de chaque échantillon.

❖ La 1^{ère} dilution des échantillons filtrés.

- La dilution de l'échantillon (A) : 1/2

On met 25 ml de la solution filtré dans une fiole de 50 ml et on complète par l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

- La dilution de l'échantillon (B, C) : 1/5.

On met 10 ml de chaque échantillon (B, C) filtré dans une fiole de 50 ml et on complète par l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

- La dilution de l'échantillon (D) : 1/200.

Après filtration de l'échantillon (D) on obtient une solution d'une couleur brun foncé pour cela on doit faire une forte dilution de cet échantillon.

On met 10 ml de l'échantillon dans une fiole de 200 ml et on complète par l'eau distillée jusqu'à le trait de jauge.

- ❖ Dans une série des béchers de 50ml en prépare une série des solutions filtrées et diluée de chaque échantillons (A, B, C, D).

N° béchers	B Eau distillé	Échantillon (A)filtré	Échantillon (B) filtré	Échantillon (C)filtré	Échantillon (D)filtré
FD°	1	2	5	5	200
Pris d'essai	25m	25ml	25 ml	25 ml	25ml
R de Folin Cocteau (ml)	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml
Solution Na ₂ CO ₃ (ml)	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml

Tableau (4) : protocole expérimentale des échantillons filtré et dilué (A, B, C, D)

- ❖ 25 ml de chaque échantillon dilué (1^{ère} dilution).
- ❖ Ajoute dans l'ordre et sans attendre entre chaque ajoute.
- ❖ 0.5ml de RFC
- ❖ 2ml de carbonates de sodium à 20%
- ❖ Placer les échantillons filtrés préparés dans l'obscurité pendant 30 min pour stabilise la réaction.
- ❖ Effectuer les lectures au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm.
- ❖ Le Blanc a été préparé en remplaçant l'échantillon par l'eau distillée.



Figure (9) : variation de la couleur en fonction de la concentration des polyphénols

2. Résultats et discussion.

- Nous avons effectué la mesure spectrophotométrique des échantillons filtrés et dilués avant et après l'ajout des réactifs (FC, Na₂ CO₃) pour déterminer la concentration des polyphénols.

❖ L'essai (1) pour la 1^{ère} dilution.

Résultats d'analyse des échantillons (filtré, diluée) avant et après l'ajout des réactifs.

			A	B	C	D	T 5mg/l
ESSAI 1	Avant l'ajout des réactifs (FC et Na ₂ CO ₃)	Facteur de dilution	2	5	5	200	
		Absorbance résiduel	0.0245	0,0114	0,0033	0,0007	
		Concentration en mg/l Donné par spectrophotomètre (DS).	0,4	0,2	0,1	0	
		Concentration(DS) x FD (Cav) mg/l.	0,8	1	0,5	0	
		Concentration (C') A partir de l'équation de la courbe d'étalonnage mg/l.	0,41	0,21	0,089	0,004	
		Abs = 0.06435C' - 0.00245					
	Après l'ajout des réactifs (FC et Na ₂ CO ₃)	Facteur de dilution	2	5	5	200	1
		Absorbance	0,2639	0,2574	0,1772	0,3419	0,3217
		Concentration (mg/l) Donné par spectrophotomètre (DS).	4,2	4	2,8	5,4	5
		Concentration (C') A partir de l'équation de la courbe d'étalonnage mg/l	4,13	4,03	2,79	5,34	5,03
		Concentration(DS) x FD mg/l (Cap)	8,4	20	14	1080	5
		Concentration final mg/l (Cf)	7,6	19	13	1080	5
Cf=Cap-Cav							

Tableau (5) : résultats d'analyse des échantillons avant et après l'ajout des réactifs.

Cap : Concentration après l'ajout des réactifs.

C av : Concentration avant l'ajout des réactifs.

FD : Facteur Dilution.

C' : Concentration C'est déterminée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage

- ❖ Le tableau (5) représente les résultats d'analyse spectrophotométrique de quatre échantillons (A, B, C, D), avant et après l'ajout des réactifs.
 - Après la dilution des échantillons et avant l'ajout des réactifs nous constatons que les échantillons A, B, C, ont des valeurs d'absorbances résiduelles qui peuvent être due à la présence des interférences, par contre l'échantillon(D) a une très faible absorbance à cause d'une forte dilution.
 - Les valeurs des concentrations calculées(C') de chaque échantillon sont déterminées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage, Ces valeurs sont presque égales les concentrations données par le spectrophotomètre.
 - D'après le tableau des résultats, les concentrations obtenues après l'ajout des réactifs, correspondent aux polyphénols et aux concentrations en fonction des absorbances résiduelles. Donc nous pouvons éliminer les absorbances résiduelles à partir de la différence entre les concentrations avant et après l'ajout des réactifs, les concentrations obtenues correspondent aux polyphénols qui ont réagi avec le réactif de FC.
 - Les composés phénoliques d'Ech (D) sont très divers, ils proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive au cours du processus d'extraction, Leur solubilisation dans les eaux de margines est cependant bien inférieure à celle dans les autres échantillons, Ce qui explique leur concentration élevée détectée dans les eaux de margines.

Donc pour diminuer ou éliminer les absorbances résiduelles des échantillons (A, B, C) nous avons augmenté le facteur de dilution de ces échantillons.

❖ La 2^{ème} dilution des échantillons filtrés.

- La dilution de l'échantillon (A) : 1/5

On met 10 ml de la solution filtré dans une fiole de 50ml et on complète par l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

- La dilution de l'échantillon (B, C) : 1/10.

On met 10 ml de chaque échantillon (B, C) filtré dans une fiole de 100ml et compléter par l'eau distillée jusqu'à le trait de jauge.

On effectue le même protocole pour ces échantillons de la 2^{ème} dilution

❖ **L'essai (2) pour la 2^{ème} dilution**

Résultats d'analyse des échantillons (filtrés, diluée) avant et après l'ajout des réactifs

			A	B	C	T 5mg/l
ESSAI 2	Avant l'ajout des réactifs (FC et Na ₂ CO ₃)	Facteur de dilution	5	10	10	
		Absorbance résiduel	0,0062	0,0028	0,0002	
		Concentration en mg/l Donné par spectrophotomètre (DS).	0,1	0,079	0	
		Concentration (DS) x FD mg/l (Cav)	0,5	0,79	0	
		Concentration(C') mg/l A partir de l'équation de la courbe d'étalonnage mg/l.	0,13	0,08	0,004	
		Abs = 0.06435C' - 0.00245				
	Après l'ajout des réactifs (FC et Na ₂ CO ₃)	Facteur de dilution	5	10	10	2
		Absorbance	0,07	0,1077	0,0677	0,147
		Concentration en mg/l Donné par spectrophotomètre (DS).	1,2	1,7	1,1	2,4
		Concentration mg /l(C') A partir de l'équation de la courbe d'étalonnage mg/l.	1,12	1,7	1,12	2,39
		Concentration(DS) x FD mg/l (Cap).	6	17	11	4,8
		Concentration final mg/l (Cf).	5,5	16.21	11	4,8
		Cf=Cap-Cav				

Tableau (6) : résultats d'analyse des échantillons de la 2^{ème} dilution avant et après l'ajout des réactifs.

❖ Le tableau (6) représente les résultats d'analyse spectrophotomètre des trois échantillons (A, B, C) après l'augmentation du facteur de dilution.

- Après l'augmentation du facteur de dilution et avant l'ajoute des réactifs on remarque une diminution des absorbances résiduelle lié à la réduction des concentrations dans les échantillons (A, B), l'échantillon (C) a une très faible absorbance qui correspond à une concentration nulle donnée par le spectrophotomètre.
- Les valeurs des concentrations calculées(C') de chaque échantillon sont presque égales à celles données par le spectrophotomètre.
- Les concentrations obtenues après l'ajout des réactifs correspondent aux polyphénols et aux concentrations détecte en fonction des absorbances résiduelles, Dans chaque échantillon nous élimines les absorbances résiduelles pour obtenir les concentrations finales des polyphénols.

D'après les résultats des deux essais les concentrations finales des échantillons d'essai 1 sont supérieur à celle de l'essai 2 car, l'augmentation du facteur de dilution est responsable de la diminution des absorbances résiduelles et aussi la diminution de la concentration finale des polyphénols, Les résultats obtenus par cette méthode représentent la concentration maximale des polyphénols car le réactif de Folin Ciocalteau n'est pas spécifique pour les composés phénoliques, il peut réagir avec d'autre substances réductrices présentent dans les eaux usées.

Conclusion

Dans ce rapport on a travaillé sur 4 échantillons différents suivant plusieurs étapes et méthodes afin de déterminer la teneur de ces échantillons en polyphénols.

- Après avoir étalonné le spectrophotomètre UV et vérifié la linéarité de la méthode du dosage par UV.
 - L'analyse spectrophotométrique par le réactif de FC a été utilisée pour déterminer la teneur des polyphénols à une longueur d'onde de 750nm
 - Nous avons étudié l'effet de la dilution sur les concentrations en fonction des absorbances résiduelles et les concentrations finales des polyphénols.
 - A partir des résultats des deux essais, nous avons conclu que parmi les facteurs influençant l'analyse des polyphénols, c'est la détection des absorbances résiduelles qui peuvent être due à la présence des interférences.

En guise de conclusion, ce stage était très bénéfique sur tous les plans, il m'a permis de faire le rapprochement entre les cours théoriques et ce qui se fait dans le monde professionnel, en outre il m'a permis de renfoncer ma personnalité et d'acquérir de nouvelles compétences qui vont me servir dans mon cursus professionnel.

Références

- [1] Guy Roulier. (s.d.). *Anti-âge, forme, bien-être : Le rôle bénéfique des polyphénols: praticien de la santé durable : ostéopathe D.O., posturologue, ancien kinésithérapeute, DU Phytoaromathérapie, DN(GB), H.P. (RFA). DAT (F).*
- [2] Sahraoui, D. (s.d.). LES COMPOSES PHENOLIQUES.
- [3] Ghedira. (2005). *Les flavonoïdes : structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. Phytothérapie. 04 : 162-169.*
- [4] Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir ... - TEL (thèses)
- [5] Bocco. (1997).). *Pouvoir antioxydant des polyphénols extraits de sous-produits d'agrumes, thèses des sciences alimentaires, ENSIA de Massy.*
- [6] Catalano, L. F. (1999). *Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. Agrochimica. INRA. FRANCE.*
- [7] CAMELLIA SINENSIS TEAS KOGA, A. Y., BUENO, N. G., & PEREIRA, A. V. (s.d.). *VALIDATION AND COMPARISON OF FOLIN DENIS AND FOLIN CIOCALTEAU METHODS FOR THE DETERMINATION OF POLYPHENOLS, State University of Ponta Grossa . Ponta Grossa.*
- [8] Mohamed, B. K. (2006). *Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes : α -amylase, trypsine et lipase.*