

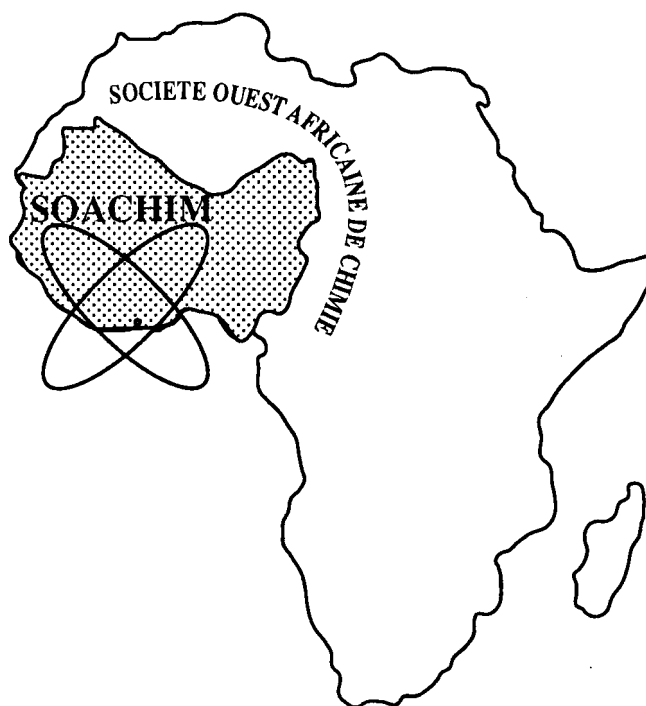
Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie

J. Soc. Ouest-Afr. Chim.

Code Chemical Abstracts : JSOCF2
Cote INIST (CNRS France) : <27680>

ISSN 0796-6687

16^{ème} Année, Juin 2011, N° 031



Site Web: <http://www.soachim.org>

Composition chimique et activité anti-oxydante de l'huile essentielle des racines de *Vetiveria zizanioides* acclimaté au Togo

Kokouvi Dotsè¹, Kokou Agbekonyi Agbodan¹, Roger H. Ch. Nébié²,
Kossi Honoré Koumaglo^{1*}

¹Laboratoire des Extraits Végétaux et Arômes Naturels (LEVAN), Faculté des Sciences, Université de Lomé, BP 1515, Togo

²Institut de Recherches en Sciences Appliquées et Technologies (CNRST), Département Substances Naturelles, 03 BP 7047 Ouagadougou 03 Burkina Faso

(Reçu le 23/10/2010 – Accepté après corrections le 02/07/2011)

Résumé : L'extraction par entraînement à la vapeur d'eau avec piégeage à l'hexane des racines de *Vetiveria zizanioides* (Poaceae) récoltées à Zévé (Sud-Togo), donne après évaporation une huile essentielle épaisse de couleur jaune avec un rendement de 1,67% par rapport à la matière sèche. L'analyse par GC et GC/MS des échantillons d'huile essentielle révèle la présence de khusimol (18,68%), d'isovalencénol (8,71%), de β -vétivone (4,92%), de nootkatone (4,89%), d' α -vétivone (4,58), de β -bisabol (2,59%), d'élémol (2,44%). Aucun acide sesquiterpénique n'a été décelé dans les conditions expérimentales utilisées. On retrouve le thymol à 4% dans l'eau florale.

La capacité anti-oxydante de l'huile essentielle et de l'extrait à l'éthanol des racines a été évaluée par les méthodes du FRAP et de la DPPH en utilisant la quercétine comme référence. L'extrait à l'éthanol possède un pouvoir antioxydant plus important que l'huile essentielle.

Mots clés. *Vetiveria zizanioides*, Racines, Huile essentielle, Composition chimique, Extrait à l'éthanol, activité anti-oxydante

Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of *Vetiveria zizanioides* roots from Togo

Summary : Steam distillation with hexan trap of *Vetiveria zizanioides* (Poaceae) roots harvested at Zévé (South of Togo), gave a thick yellow colour essential oil with an overall yield of 1,67% (dry matter). GC and GC/MS analyses of essential oil showed that the major components were khusimol (18,68%), isovalencenol (8,71%), β -vetivone (4,92%), nootkatone (4,89%), α -vetivone (4,58), β -bisabol (2,59%) and elemol (2,44%). Any sesquiterpenic acid was detected but thymol (4%) was present in the floral water.

Antioxidant capacity of essential oil and ethanol extract from roots was evaluated by the DPPH free radical scavenging assay with quercetine as positive control and the Ferric-reducing antioxidant power assay (FRAP). Ethanol extract exhibited the best radical scavenging activity and reducing power than the essential oil.

Keywords: *Vetiveria zizanioides*, Roots, Essential oil, Chemical composition, Ethanol extract, antioxidant activity

* Adresse de correspondance : hkoumagl@yahoo.fr

1. Introduction

Il existe au Togo deux espèces de vétiver (Poaceae) qui poussent généralement dans des zones hydromorphes. *Vetiveria nigriflora* est souvent présent à proximité des cours d'eau dans les zones soudano-sahéliennes. L'espèce se retrouve en Afrique, de la Mauritanie au Nigéria et du nord-est au sud de la zone tropicale^[1-3]. En Afrique de l'ouest par exemple, les racines séchées sont vendues dans les marchés et servent à purifier et/ou aromatiser l'eau de boisson. La seconde espèce rencontrée au Togo est *V. zizanioides*. Elle est beaucoup plus présente dans les zones tropicales humides. L'espèce, originaire de l'Inde, a été introduite dans plusieurs pays tropicaux (Java, Réunion, Haïti,)^[4].

De manière très artisanale, les deux espèces de vétiver sont utilisées pour stabiliser les sols et lutter contre l'érosion^[5-6]. Elles possèdent une grande tolérance à l'acidité, à la basicité, à la salinité et sont utilisées dans la mise en valeur et la réhabilitation des terrains contaminés par des métaux lourds.

En raison du point d'ébullition élevé des composants volatils et de leur viscosité, la distillation des racines du vétiver se fait par entraînement à la vapeur à la pression de 4 à 5 atmosphères pendant 12 à 36 heures. Le rendement d'extraction varie en fonction de l'âge de la matière végétale ; il est généralement meilleur avec des racines des plantes de 24 mois. Avec des racines séchées de l'Ile de Java, le rendement est généralement supérieur à 3%. L'extraction par la méthode du CO₂ supercritique donne des rendements beaucoup plus élevés^[7].

L'huile essentielle des racines de *V. zizanioides* est très appréciée par les parfumeurs à cause de sa forte odeur boisée balsamique. Elle est utilisée en parfumerie et en aromathérapie. Les principaux pays producteurs sont Haïti, le Brésil, la Chine, l'Inde, la Réunion, le Madagascar^[8-10]. Malgré son acclimatation en Afrique de l'Ouest, et ses capacités de réhabilitation et de fixation des sols, *V.*

zizanioides n'est pas suffisamment étudié et exploité dans cette région.

Le but de la présente étude est de déterminer la composition chimique de l'huile essentielle du *V. zizanioides* acclimaté au Togo et d'apprécier le potentiel anti-oxydant des extraits des racines.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Extraction de l'huile essentielle

Les racines de *V. zizanioides* sont prélevées sur un site de culture de Zévé dans la région maritime. Les racines lavées sont séchées à l'ombre pendant 30 jours. La distillation est faite par entraînement à la vapeur d'eau à la pression atmosphérique. On ajoute de l'hexane à l'eau du séparateur pour le piégeage de l'huile essentielle. A la fin de la distillation, la phase organique est alors évaporée sous vide.

2.2 Extraction à l'éthanol des racines

Pour l'extrait à l'éthanol, 30g de racines séchées et broyées sont extraites avec 200mL d'éthanol 95° pendant 8 heures sous agitation. Le mélange est filtré, la solution est évaporée à sec et le résidu devant servir aux différents tests est pesé et conservé au réfrigérateur.

2.3 Analyse de l'huile essentielle

Les analyses par GC sont effectuées sur un appareil de type HP 5890 équipé d'un détecteur FID maintenu à 300°C, d'un injecteur à 250°C, d'une colonne apolaire HP-1 (60m x 0,32mm x 0,25µm) et d'une colonne polaire HP-FFAP (30m x 0,32mm x 0,25µm). La flamme du détecteur est entretenue par un mélange Hydrogène / Air à des débits de 30 et 300 mL/min respectivement. Le débit du gaz vecteur (azote) est de 1 mL/min. La programmation de température est de 45°C en isotherme pendant 10 min, puis 200°C pendant 10 min avec un gradient de 2°C/min. Le volume injecté est de 0,2 µL. Les résultats sont enregistrés sur un

intégrateur de type HP-3396 Série II. L'analyse au GC/MS est réalisée sur un équipement Agilent 5973 muni d'une colonne apolaire HP1-MS 60m x 0,25mm x 0,25µm à une température initiale de 60°C en isotherme pendant 10 min, puis à une température finale de 300°C pendant 20 min ; le gradient étant de 2°C/min. Le débit du gaz vecteur (hélium) est de 1mL/min. Le détecteur du spectromètre de masse est de type HED/EM (High energy dynode/electron multiplier 0-3000V) avec une énergie de 70eV ; les autres paramètres restant identiques.

2.4 Indice de réfraction

La mesure de l'indice de réfraction a été effectuée à l'aide d'un réfractomètre de type N.O.W. (Nippon Optical Works).

2.5 Evaluation des propriétés anti-oxydantes

Les tests d'anti-oxydant ont été réalisés par les méthodes de DPPH et FRAP avec la quercétine comme référence.

2.6 Test de réduction du radical DPPH^[11]

A partir d'une solution méthanolique de 1000 mg/L d'huile essentielle de *V. zizanioides*, on procède à des dilutions successives pour obtenir des concentrations de 25, 50, 100, 154, 182, 200, 400, 800 ppm.

Pour l'extrait à l'éthanol des racines de *V. zizanioides*, des solutions de 100, 200, 500, 205, et 1000 ppm ont été préparées.

A 1500µL d'une solution de DPPH à 100µmol/L fraîchement préparée, sont ajoutés 250µL de l'échantillon. Le mélange est agité au vortex et l'on procède à la lecture de la densité optique (D.O) à 517 nm après 20 min (spectromètre de marque Varian, DMS 300). Pour chaque concentration, les tests sont réalisés en triplicata et une moyenne des trois valeurs est faite. La formule de la relation 1 permet de déterminer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(Ab - Ae)}{Ab} \times 100 \quad (1)$$

Ab et Ae représentent respectivement l'absorbance en présence du méthanol seul et l'absorbance en présence de l'échantillon à tester.

L'intensité colorante (IC₅₀) représente la quantité d'huile essentielle nécessaire pour diminuer la coloration de la solution du réactif DPPH de moitié (50%). Elle est déterminée à partir de l'équation de la droite établie en portant les D.O en fonction de la concentration d'huile essentielle. Les résultats sont exprimés en ppm.

2.7 Test du FRAP^[12]

Le sulfate de Fer II hepta hydraté (FeSO₄.7H₂O, 11,12mg) est dissout dans 20mL de méthanol. A partir de cette solution mère, des dilutions successives sont faites pour obtenir des solutions de concentrations 200, 500, 800, 1000, 1400, 1600, 1800, 2000µmol/L. Les volumes de 1500µL du réactif FRAP, 150µL d'eau distillée et 50µL de la solution du Fe²⁺ sont introduits dans un tube à essai. Le mélange est agité au vortex et la densité optique est lue après 5 min à 593 nm (spectromètre de marque Varian, DMS 300). Les valeurs obtenues permettent de tracer la courbe standard. L'échantillon à tester est en solution dans le méthanol à une concentration de 1000ppm. Pour la mesure de la densité optique de l'échantillon à tester, 1500µL du réactif FRAP, 150µL d'eau distillée et 50µL de la solution de l'échantillon d'huile essentielle sont introduits dans un tube à essai. La densité optique obtenue est reportée sur la courbe d'étalonnage et l'activité anti-oxydante est déterminée en équivalent Fe²⁺ (µmol/L).

3. Résultats et Discussion

3.1 Extraction de l'huile essentielle

L'extraction a duré 30 heures et a permis d'obtenir une huile essentielle d'aspect visqueux de couleur jaune avec un

rendement de 1,67%. Les valeurs d'indice de réfraction se situent entre 1,5215 et 1,5231. Ce qui est conforme aux données de la littérature qui varient de 1,5140 à 1,5241 pour l'huile essentielle de la Réunion et de 1,5258 à 1,5271 pour des productions de Java [13]. Lorsque l'extraction est conduite sans piégeage à l'hexane, l'huile essentielle est en grande partie dissoute dans l'eau. En général, le rendement d'extraction varie avec l'âge de la biomasse, la durée d'extraction et la technique utilisée. Les meilleurs rendements compris entre 2 et 3% sont obtenus à des pressions relativement élevées de 4 à 5 atmosphères. L'addition de l'hexane à l'eau du séparateur favorise une rétention à plus de 95% et le taux d'huile essentielle résiduelle contenue dans la phase aqueuse est moins de 0,05%. Pour cette extraction, nous avons utilisé de l'hexane alimentaire exempt de DEHP.

3.2 Composition chimique de l'huile essentielle

Le **tableau I** donne la composition chimique de l'huile essentielle après analyses aux GC et GC/MS. Dans notre cas, 21 composés ont été identifiés représentant 55% de l'huile essentielle et le khusimol est le composé majoritaire à environ 18,68%. Les autres composés relativement importants sont l'isovalencénol (8,71%), la β -vétivone (4,92%), l' α -vétivone (4,58%), le nootkatone (4,89%). En principe, les composés responsables de la note boisée balsamique tant appréciée sont le khusimol, la vétivone, l'eudesmol, la khusimone, le zizaène, et le prézizaène qui constituent l'empreinte digitale de l'huile de vétiver [13]. D'autre part, l'huile essentielle est mieux appréciée lorsqu'elle ne contient pas d'acide zizanoïque, ce qui est le cas avec l'espèce acclimatée au Togo.

Dans d'autres études, un nombre plus

important de composés ont été identifiés. En effet, en Thaïlande 37 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle de l'espèce, au Brésil 61 composés, en Inde 63 composés, à Java 70 composés, à Madagascar 59 composés, 170 composés à Hong Kong. Dans la plupart des études réalisées sur l'huile essentielle de l'espèce, les composés identifiés sont en majorités des sesquiterpènes et leurs dérivés [4,14-17].

Comparativement à l'espèce acclimatée au Togo, les composés majoritaires dans l'huile essentielle de l'espèce acclimatée en Thaïlande [13] sont le (Z)-9,10-déhydro-2-norzizaène (20,78%), la khusimone (20,57%) et le khusimol (11,11%). Comme on peut le constater, le khusimol et la khusimone se trouvent dans l'huile essentielle de l'espèce du Togo, par contre le (Z)-9,10-déhydro-2-norzizaène n'a pas été identifié. La khusimone se trouve à un taux de 1,63% dans l'huile essentielle de l'espèce du Togo contre 20,57% dans celle de Thaïlande. Par contre les huiles essentielles des espèces acclimatées au Brésil, en Chine, en Haïti, en Inde, à Java, à Madagascar, au Mexique, en Réunion et à Salvador contiennent principalement du β -Vétispirène (1,6-4,5%), du khusimol (3,4-13,7%), du vétisélinénol (1,3-7,8%) et la vétivone (2,5-6,8%).

L'analyse par GC du résidu d'extraction de l'eau florale indique par comparaison, une forte contribution en thymol à plus de 4% bien que ce composé n'ait pas été identifié dans les échantillons d'huile essentielle. Aussi, il n'a pas été rapporté dans les autres cas dont nous avons pris connaissance dans la littérature. Il nous semble cependant propice d'indiquer que dans des expériences antérieures sur *Ocimum gratissimum* et *Thymus vulgaris* l'eau florale est davantage riche en thymol lorsque l'huile essentielle en contient [18]. Dans ces cas particuliers, l'eau florale peut être utilisée en aromathérapie pour le traitement de certaines infections.

Tableau I : Composition chimique de l'huile essentielle de *V. zizanioides* acclimaté au Togo

N°	Composés	Pourcentage (%)
1	Cyclosativène	0,09
2	β-maaliène	0,08
3	α-copaène	0,14
4	di-épi-α-cédrène	0,34
5	Aromadendrène	1,09
6	δ-cadinène	0,36
7	β-vétivénène	0,45
8	trans calamène	0,11
9	α-calacorène	1,29
10	Elémol	2,44
11	β-calacorène	0,20
12	Khusimone	1,63
13	τ-muurorol	0,95
14	β-eudesmol	1,52
15	α-eudesmol	0,83
16	β-bisabolol	2,59
17	Khusimol	18,68
18	Isovalencénol	8,71
19	Nootkatone	4,89
20	β-vétivone	4,92
21	α-vétivone	4,58
-	Total	55,89

3.3 Activité anti-oxydante de l'huile essentielle

La comparaison de l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle de *V. zizanioides* à celle de la quercétine par la méthode du DPPH donne des valeurs de IC₅₀ de 20,10 ppm pour la substance de référence (quercétine) et 3590 ppm pour l'huile essentielle. Des essais réalisés avec l'extrait éthanolique total des racines de *V. zizanioides*, donnent une valeur moyenne de IC₅₀ de 1297ppm. Il se dégage donc que l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle de *V. zizanioides* est faible par rapport à la référence. Il en est de même pour l'extrait éthanolique total qui est cependant plus actif que l'huile essentielle. La capacité totale anti-oxydante déterminée par la méthode FRAP confirme les résultats obtenus. En effet, par la méthode FRAP nous avons 23 équivalents de Fe²⁺ (□mol.L⁻¹) pour l'huile essentielle

de *V. zizanioides* et 160 équivalents de Fe²⁺ pour l'extrait à l'éthanol des racines de l'espèce, soit une activité anti-oxydante six fois plus élevée de l'extrait total par rapport à l'huile essentielle.

La différence de l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle et de l'extrait total est certainement liée à la présence dans les extraits à l'éthanol de flavonoïdes qui sont des composés polyphénoliques à activité anti-oxydante connue^[19].

Des travaux similaires sur l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle de vétiver ont été réalisés par Hyum-Jin Kim et al.^[14]

Les résultats montrent une activité anti-oxydante deux fois moins élevée que nos résultats. En effet, par la méthode de DPPH, l'huile essentielle de *V. zizanioides* achetée dans le commerce à Hong Kong à une valeur moyenne de IC₅₀ = 7790 ppm contre 20ppm pour le BHT et l'α-tocophérol. Ces auteurs ont également montré, à partir d'un fractionnement de

l'huile essentielle, que l'activité anti-oxydante était plus liée à certains composés mineurs de l'huile essentielle (le β -vétivénène, la β -vétivone et l' α -vétivone) qu'aux composés majoritaires (le kusunol, le bicyclo-vétivénol).

La différence entre l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle de l'espèce acclimatée au Togo par rapport à l'huile du vétiver de Hong Kong serait liée à leur composition chimique. En effet, l'espèce acclimatée au Togo contient certes le β -vétivénène (0,45%), la β -vétivone (4,92%) et l' α -vétivone (4,58%), mais possède aussi d'autres composés non négligeables qui pourraient contribuer à l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle et qui ne sont pas présents dans l'huile essentielle de Hong Kong. Il s'agit de l'isovalencénol (8,71%), de β -bisabolol (2,59%) et de l'élémol (2,44%).

4. Conclusion

A notre connaissance c'est la première fois que l'huile essentielle de *V. zizanioides* acclimaté au Togo a été étudiée. L'addition de l'hexane à l'eau du séparateur permet d'optimiser le rendement de l'huile essentielle obtenue. Le profil chimique se compare aisément à celui d'autres échantillons disponibles sur le marché. Le thymol n'a pas été détecté dans l'huile essentielle mais se retrouve à plus de 4% dans l'eau florale. L'activité anti-oxydante des extraits totaux des racines de l'espèce du Togo est six fois plus importante que celle de l'huile essentielle qui est elle-même serait deux fois plus active que l'huile essentielle de vétiver de Hyum-Jin Kim et al.^[14].

[1]. Burkill H.M. The useful Plants of West Tropical Africa, vol. 2 Royal Botanic Gardens: London, 1994; 375.

[2]. Berhaut J. Flore du Sénégal, 2nd edn. Clairafrique : Dakar, 1967 ; 485p.

[3]. Hutchinson J., Dalziel J.M., Flora of West Tropical Africa, 1st edn, vol. III.

Millbank: London, 1972; 470.

[4]. Champagnat P., Figueredo G., Chalchat J.-C., Carnat A.-P., Bessière J.-M., A study on the composition of commercial *Vetiveria zizanioides* oils from different geographical origins. J. Essent. Oil Res. (2006) 18; 416-422.

[5]. Dalton P.A., Smith R.J., Truong P.N.V. Vetiver grass hedges for erosion control on a cropped flood plain, hedge hydraulic. Agr. Water Manage. (1996) 31; 91-104.

[6]. Tscherning K., Leihner D.E., Hilger T.H., Müller-Sämann K.M., El-Sharkawy M.A. Grass barriers in cassava hillside cultivation: Rooting patterns and root growth dynamics. Field Crop. Res. (1995) 43; 131- 140.

[7]. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., Biologiccal effects of essential oils. A review, Food and chem Toxicology; (2006) 46; 446-475.

[8]. Chowdhury A.R., Kumar D., Lohani H., GC-MS analysis of essential oils of *Vetiveria zizanioides* (Linn.) Nash roots. Fafai J. (2002); 33-35.

[9]. Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D. New sesquiterpene ethers from Vetiver oil. Liebig's Ann. (1996); 1195-1199.

[10]. Bowles J.E., Griffiths D.M., Quirk L., Brownrigg A., Croot K. Effects of essential oils and touch on resistance to nursing care procedures and other dementia-related behaviours in a residential care facility. Int. J. Aromat. (2002) 12; 22-29.

[11]. Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., Mc Donald S., Robards K., Methods for testing antioxydant activity. Analyst (2002) 127; 183-198.

[12]. Benzie I.F.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a mesure of antioxidant power: the FRAP assay. Anal. Biochem. (1996) 239; 70-76.

[13]. Pripdeevech P., Wongpornchai S., Promsiri A.. Highly volatile constituents of *Vetiveria zizanioides* roots grown under different cultivation conditions. Molecules (2006) 11(10); 817-826.

- [14]. Kim H.-J., Feng C., Xi W., Hau Y. C., and Zhengyu J.. Evaluation of antioxidant activity of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents. *J. Agric. Food Chem.*, (2005) 53 (20), 7691–7695.
- [15]. Nigam I.C., Radecka C., Komae H. Essential oils and their constituents XXXVII. Isolation and structure of khusenol, a new sesquiterpenic primary alcohol from oil of vetiver. *J. Pharm. Sci.* (1968) 57(6), 1029-1030.
- [16]. Bombarda I., Gaydou E. M., Smadja J., Faure R. Sesquiterpenic epoxides and alcohols derivated from hydrocarbons of vetiver essential oil. *J. Agric. Food Chem.* (1996) 44(1), 217-222.
- [17]. Weyerstahl P., Marschall H., Splittgerber U., Wolf D., Surburg H. Constituents of Haïtian vetiver oil. *Flavour Fragrance J.* (2000) 15; 395-412.
- [18]. Kokouvi Dotse. Extraction de l'huile essentielle de *Vetiveria zizanioides* : performances de la méthode de piégeage à l'hexane et caractérisation de l'huile. Mémoire de diplôme d'ingénieur des travaux en gestion de l'eau et de l'environnement/ESTBA, Université de Lomé. (2009).
- [19]. Champagnat P., Heitz A., Carnat A., Fraisse D., Carnat A.-P., Lamaison J.-L.. Flavonoids from *Vetiveria zizanioides* and *Vetiveria nigriflora* (Poaceae). *Biochemical systematics and ecology* (2008) 36(1), 68-70.