

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Alimentaires  
Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

## **MASTER**

### *Thème*

**Optimisation des conditions d'extraction  
des composés phénoliques à partir des  
feuilles de goyavier (*Psidium guajava*)**

Présenté par :

**Chellah Assia**

Soutenu le : **02 Juillet 2019**

Devant le jury composé de :

Mme. Kouachi kahina	MCA	Président
Mme. Chougui Nadia	MCA	Encadreur
Mme. Brahmi Nabila	MCB	Examineur

**Année universitaire : 2018 / 2019**

# ***Remerciements***

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force, le courage, la persistance et m'a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail.

Je tiens à remercier ma promotrice Mme Chougui, pour l'honneur d'avoir accepté à m'encadrer. Je vous exprime, madame, toute ma gratitude pour tous vos efforts, votre gentillesse, votre disponibilité et vos précieux conseils qui ont contribué à la réalisation de ce travail

Je tiens à remercier aussi :

Mme Kouachi Kahina, d'avoir consacré de son temps en me faisant l'honneur de présider le jury et d'évaluer mon travail ;

Mme Brahmi Nabila, de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Pour n'oublier personne, mes vifs remerciements s'adressent à tous ceux qui m'ont aidé à la réalisation de ce modeste mémoire.

# *Dédicaces*

Je dédie ce modeste travail a :

Ma mère pour son affection, son soutien, ces efforts et sacrifices qu'elle a  
entrepris afin de me voir réussie.

Mon père que dieu l'accueille dans son vaste paradis.

Mon frère Hafid, son épouse et ces enfants : Asma, Fofu et Saleh

Mes frères : khodir et Nounour

Mes sœurs : Naima, Zina, khokha

Toute la famille Chellah et Djemaa

Mes chères copines de chambre Hanane et Sonia

Toutes mes chères amies et surtout Kami, Nadira, Kahina, Badoura

A toute la promotion de Qualité des produits et sécurité alimentaire

Et à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce  
mémoire.

**Chellah Assia**

**Abs** : Absorbance

**AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium

**CPT** : Composés phénoliques totaux

**DPPH** : 1,1-diphényl -2-picryl-hydrazyl

**EAG** : Equivalent d'acide gallique

**Eβ-C** : Equivalent β-carotène

**EC** : Equivalent cyanidine

**EQ** : Equivalent en quercétine

**Fe Cl<sub>2</sub>**:Chlorure ferreux

**Mo**: Molybdate

**MS** : Matière Sèche

<b>Figures</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	Distribution de la goyave dans le monde	3
2	Description du goyavier	5
3	Structures chimiques des différents composés retrouvés dans <i>Psidium guajava</i> L	7
4	Structure de l'acide ascorbique	10
5	Structure chimique de $\beta$ -carotène	10
6	Structure de base des flavonoïdes	11
7	Structure d'un tannin hydrolysable (a) et d'un tannin condensé (b)	12
8	Structures chimiques des principaux composés d'huile essentielle des feuilles de <i>P. guajava</i>	13
9	Propriétés biologiques et thérapeutiques des polyphénols	14
10	Photographie des feuilles du goyavier	18
11	Photographie de la poudre des feuilles du goyavier	18
12	(a) : Teneurs en composés phénoliques totaux, (b) : Inhibition du DPPH* des extraits des feuilles obtenus par différents solvants d'extraction.	27
13	(a) : Teneurs en composés phénoliques, (b) : Inhibition du DPPH*, des extraits des feuilles obtenus par différentes concentrations de l'éthanol.	28
14	Influence de la variation de la quantité de la matrice sur la teneur des feuilles du goyavier en composés phénoliques totaux (a), et sur l'inhibition du DPPH* (b).	30
15	Influence de variation de volume de solvant sur la teneur des feuilles du goyavier en composés phénoliques totaux (a), et sur l'inhibition du DPPH* (b).	31
16	Influence de la température sur la teneur des feuilles de goyavier en polyphénols totaux (a), et sur l'inhibition du DPPH* (b)	32
17	Influence du temps d'extraction sur la teneur des feuilles de goyavier en CPT (a), et sur l'inhibition du DPPH* (b).	33
18	Influence de nombre d'extraction sur la teneur des feuilles de goyavier en CPT (a), et sur l'inhibition du DPPH* (b).	34
19	Teneur en antioxydants des extraits des feuilles du goyavier	35

<b>No</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
I	Composition nutritionnelle de la goyave	5
II	Composition chimiques de la goyave en minéraux et vitamine	6
III	Les antioxydants de la goyave	7
IV	Les antioxydants des feuilles du goyavier	9
X	Rendement des extraits de poudre de feuilles du goyavier	26
VI	Des activités antioxydantes des extraits de poudre de feuilles du goyavier	37

# Table des matières

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction.....1**

## **Synthèse bibliographique**

### **I. Généralités sur le Goyavier**

1. Origine.....3

2. Répartition géographique et production du goyavier.....3

2.1. Dans le monde.....3

2.2. En Algérie.....4

3. Systématique du goyavier.....4

4. Description botanique.....4

5. Composition nutritionnelle de la Goyave.....5

6. Antioxydants .....6

7. Utilisations et avantages de *P. guajava L* .....8

### **II. Les antioxydants des feuilles de goyave**

1. Les antioxydants des feuilles du goyavier.....9

2.1 Acide ascorbique (Vitamine C).....9

2.2 Les caroténoïdes.....10

2.3 Les composés phénoliques totaux.....10

2.3.1. Les flavonoïdes.....11

2.3.2 Les tannins.....	12
3. Composition chimique des feuilles du Goyavier.....	13
4. Autres composants des feuilles du goyavier .....	14
5. Rôles des antioxydants .....	14
6. Effets thérapeutiques des feuilles du goyavier.....	15
6.1 Effet antitumoral et anticancéreux.....	15
6.2. Effet Antimicrobien.....	15
6.3. Effet antidiarrhéique.....	15
6.4. Effet hypoglycémiant.....	16
6.5. Effet antidiabétique .....	16
6.6. Effet Antiinflammatoire.....	16
6.7. Gastroentérites infantiles dues au rotavirus.....	16
6.8 Effet hépatoprotecteur.....	17
6.9. Effet cardioprotecteur.....	17
6.10. Effet antitussif .....	17
6.11 Autres effets .....	17

## **Partie pratique**

### **I. Matériel et méthodes**

1. Matrice végétale.....	18
1.1. Choix de la matrice.....	18
1.2. Récolte et séchage .....	18
1.3. Broyages et tamisage .....	18
2. Test d'humidité.....	19
3. Extraction des composés phénoliques totaux .....	19
4. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques .....	19

4.1. Optimisation de la nature du solvant d'extraction.....	20
4.2. Optimisation de la concentration du solvant d'extraction .....	20
4.3. Optimisation de ration (variation de la quantité de la matrice).....	20
4.4. Optimisation de ration (variation de volume du solvant).....	20
4.5. Optimisation de la température d'extraction.....	21
4.6. Optimisation du temps d'extraction.....	21
4.7. Optimisation du nombre d'extraction.....	21
5. Dosage des antioxydants.....	21
5.1. Dosage des composés phénoliques totaux.....	21
5.2. Dosage des flavonoïdes.....	22
5.3. Dosage des tanins condensés (proanthocyanidines).....	22
5.4. Dosage des caroténoïdes.....	23
6. Activités antiradicalaire et antioxydante.....	24
6.1. Inhibition du DPPH (pouvoir antiradicalaire).....	24
6.2. Pouvoir réducteur.....	24
6.2. 1.Réduction du phosphomolybdate (PMB).....	24
6.2. 2.Réduction du chlorure ferrique (FeCl <sub>3</sub> ).....	25
7. Analyse statistique.....	25

## **II. Résultats et discussion**

1. Taux d'humidité.....	26
2. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques totaux.....	26
2.1 Optimisation de la nature du solvant d'extraction.....	26
2.1.1. Rendement .....	26
2.1.2. Teneurs en composés phénoliques totaux.....	27
2.2. Optimisation de la concentration du solvant d'extraction .....	28
2.3. Optimisation de ration (variation de la quantité de la matrice).....	29
2.4. Optimisation de ration (variation de volume de solvant).....	30
2.5. Optimisation de la température d'extraction.....	32
2.6. Optimisation du temps d'extraction.....	33
2.7. Optimisation du nombre d'extraction.....	34
3. Teneur en antioxydants.....	35
3.1. Teneur en CPT.....	36

3.2. Teneur en flavonoïdes.....	36
3.3. Teneur en tanins.....	36
3.4. Teneur en caroténoïdes.....	36
4. Activités antioxydantes .....	37
4.1. Activités antiradicalaire (Inhibition du DPPH*) .....	37
4.2. Pouvoir réducteur .....	38
4.2. 1.Réduction du phosphomolybdate (PMB).....	38
4.2. 1.Réduction du chlorure ferrique (FeCl <sub>3</sub> ).....	38
<b>Conclusion</b> .....	39

## **Références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumé**

# *Introduction*

Depuis l'antiquité, les produits naturels ont été utilisés comme agents thérapeutiques pour le traitement de différentes maladies. Un nombre important de médicaments traditionnels à base de plantes sont disponibles sur le marché mondial **(Weli et al., 2018)**.

L'Algérie, classé le pays le plus grand en surface en Afrique, possède un énorme réservoir botanique. Parmi les plantes qu'on peut trouver, *Psidium guajava L.* (plante appartient à la famille Myrtacée), appelé communément goyavier. Cette plante est méconnue ou peu connue par notre communauté.

Traditionnellement, *Psidium guajava* est exploité en région tropical. En plus du fruit qui est souvent consommé frais ou transformé en jus et nectars et utilisé dans la médecine pour ses pouvoirs et vertus nutritionnels et antioxydantes, les feuilles sont, également, employées dans de nombreuses régions du monde pour le traitement d'un certain nombre de maladies, telles que le cancer, l'inflammation, le diabète, l'hypertension, les caries, les blessures, le soulagement de la douleur, la réduction de la fièvre et d'autres maux **(Ferlay et al., 2007; Gutiérrez et al., 2008; Singh, 2011; Ashraf et al., 2016)**. Ces effets sont attribués la composition des feuilles de goyavier qui est abondante en composés phénoliques (flavonoïdes, caroténoïdes et tanins) connus pour leur effet sur le stress oxydatif et par conséquent sur la prévention des maladies suscitées **(Qian et Nihorimbere, 2004 ; El-Ahmady et al., 2013 ; Guillouty, 2016)**. Ceci explique notre intérêt pour cette partie du goyavier.

L'obtention de ces substances bioactives (composés phénoliques) à partir d'une matrice végétale doit passer par une extraction qui est une phase primordiale et très importante pour leur isolement, leur identification, et leur utilisation. Elle dépend de plusieurs facteurs tels que le type du solvant, la nature de la matrice végétale à extraire, la structure chimique des composés phénoliques, le temps d'extraction ainsi que la température qui peuvent influencer d'une manière significative la qualité et la quantité des substances extraites **(Buvi-Koji et al., 2011 ; Dent et al., 2013)**.

Ce présent travail rentre dans cet optique, il a pour objectif, d'une part, d'optimiser les conditions d'extraction des composés phénoliques en testant sept paramètres notamment : la nature du solvant d'extraction, la concentration du solvant d'extraction, la ration (variation de la quantité de la matrice), la ration (variation de volume de solvant), la température d'extraction, le temps d'extraction et en fin, le nombre d'extraction, et d'autre part, de doser les antioxydants dans l'extrait obtenu une fois les

paramètre optimisés ainsi que d'évaluer les activités antioxydantes par le test d'inhibition du DPPH et le pouvoir réducteur du phosphomolybdate et du fer ferrique.

# ***Synthèse bibliographique***

# *Généralités sur le Goyavier*

## 1. Origine

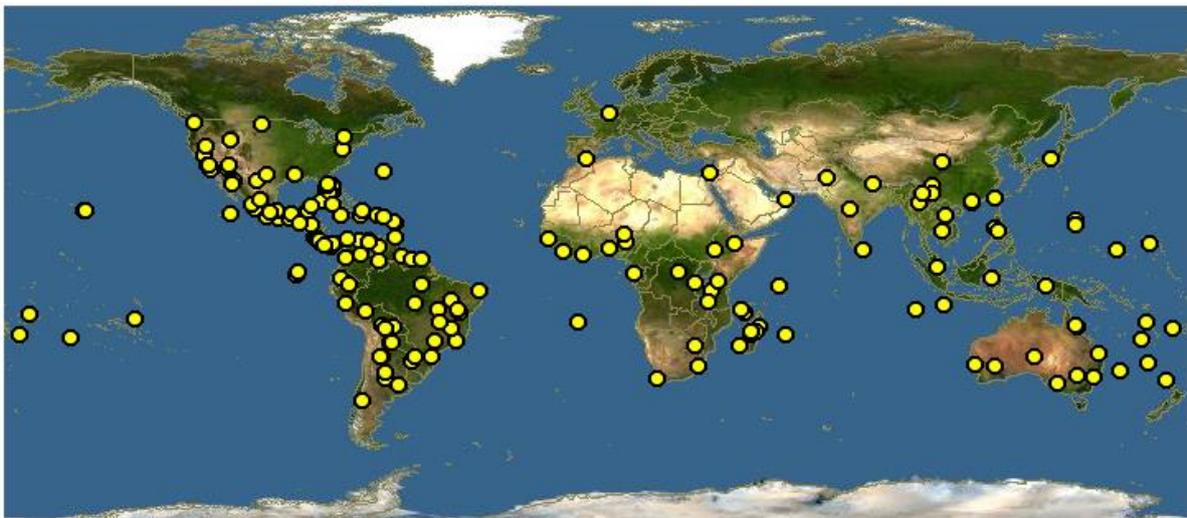
Le goyavier « *Psidium guajava L.* » est une espèce d'arbre fruitier originaire d'Amérique tropicale (du Mexique plus précisément). On le retrouve, également, en Europe, en Afrique et en Asie. Il pousse dans toutes les zones tropicales et subtropicales du monde. Il est habitué, donc, à la chaleur et ne résiste pas à des températures inférieures à  $-2^{\circ}\text{C}$  (Le Bourdelles et Estanove, 1967).

## 2. Répartition géographique et production du goyavier

### 2.1. Dans le monde

Le goyavier est une culture vivrière importante dans les pays tropicaux et subtropicaux, elle est largement utilisée comme aliment et dans la médecine traditionnelle, cet arbre est trouvé dans différentes régions (Figure 1) (Gutiérrez et al., 2008). La distribution naturelle du goyavier aurait été largement étendue par l'agriculture indigène, avant l'arrivée des Européens sur le continent américain (Vasqueza et al., 2002).

Le fruit de goyavier appelé, également, goyave est l'un des fruits le plus exploité en région tropicale, il est souvent consommé frais ou transformé en jus et nectars. La production de goyave dans le monde atteignait plus de 500000 tonne en 1981, les principaux producteurs sont : l'Inde, Mexique, Pakistan, Colombie, Égypte, Brésil, Venezuela, Afrique du Sud, Kenya, Hawaï, et actuellement l'Inde est le plus gros producteur de pulpe de goyave (Bourgeois et al., 1998).



**Figure 1 :** Distribution de la goyave dans le monde (<https://www.discoverlife.org>).

## 2.2. En Algérie

En Algérie, on peut le trouver qu'à Fouka (Tipaza) appelé, également, « goyabes ». Il a été introduit à la fin des années 1970 à titre d'expérimentation, selon Hadj Ahmed Hamada, le seul agriculteur de ce fruit. En 1978, il a été créé un verger de 2 hectares au niveau d'un ex-domaine agricole social (Das) à Fouka, qui relevait à l'époque de la wilaya de Blida, qui porte aujourd'hui le nom de Domaine M'seguem-Abdelkader, sur la route de Douaouda. Abandonné en 1987, il a été repris en 1991 par Hadj Hamada pour pouvoir préserver ce fruit exotique. Aujourd'hui cet agriculteur, récolte près de 3 tonnes par ans, commercialisés uniquement à Fouka (<https://www.djazairss.com>).

## 3. Systématique du goyavier

Selon Dakappa et *al.* (2013), le goyavier appartient à la classification suivante :

**Règne :** Plantae

**Sous-règne :** Tracheobionta

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous-classe :** Rosidae

**Ordre :** Myrtales

**Famille :** Myrtaceae

**Genre :** *Psidium*

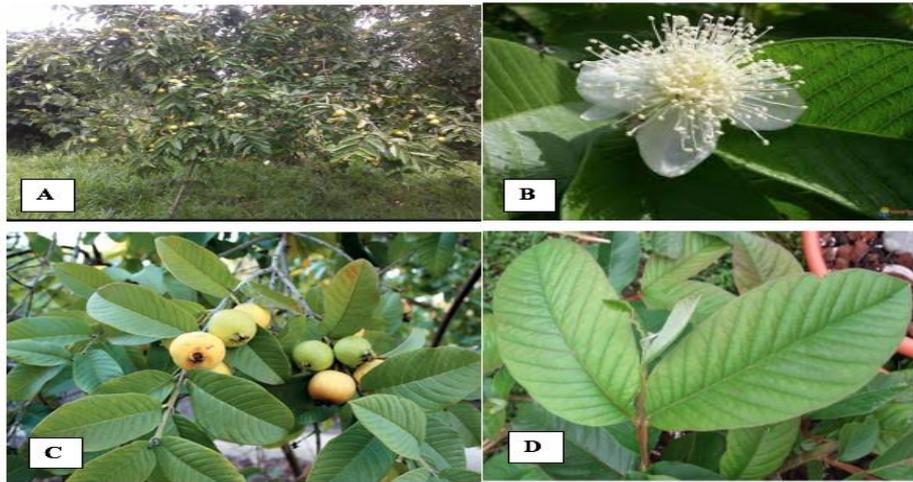
**Espèce :** *Psidium Guajava*

## 4. Description botanique

Selon la classification phylogénétique, le goyavier (*Psidium guajava* L.) est classé dans la famille des *Myrtaceae*. C'est un arbre petit, légèrement noueux, très robuste. Il peut atteindre 10 m de hauteur mais généralement retrouvé sous forme d'arbuste en culture. Les feuilles sont opposées, oblongues-elliptiques à ovales, mesurent de 15 cm de longueur et 7 cm de largeur, la face dorsale est recouverte d'un duvet fin (**Romocea et al., 2008**).

Les fleurs sont blanches et mesurent 2,5 cm de diamètre. Elles présentent de nombreuses étamines, et sont individuelles ou groupées à 2 ou 3 sur un pédoncule. Le fruit sont sphériques, ovoïdes et peuvent atteindre 10 cm de longueur. La chair est d'épaisseur variable, blanche, rose ou saumon, de consistance légèrement crémeuse, de saveur douce à acide. On

retrouve de nombreuses graines sous une enveloppe rigide (Rohwer et Dubourg-Savage, 2002). La Figure 2 illustre les différentes parties du goyavier :



**Figure 2** : Description du goyavier : arbre (A) ; fleur (B) ; fruit (C) ; feuille (D) (Guillouty, 2016).

## 5. Composition nutritionnelle de la Goyave

Selon l'étude de **Dignan et al. (2004)**, la goyave est un fruit riche en eau soit 87 g/100 g MS, mais peu chargé en sucres, sa teneur moyenne en glucides est de l'ordre de 3,5 g/100 g MS. Les autres constituants énergétiques ne sont présents qu'en faibles proportions : 0,7 g de protéines, et 0,5 g de lipides pour 100 g MS. Ces composants glucidiques sont responsables de l'apport caloriques de la goyave : 31 calories /100 g MS, un apport très modéré, puisqu'il se situe au niveau de celui de la framboise ou de la groseille, fruits réputés peu énergétiques. La goyave renferme enfin beaucoup de fibres, son taux de 5,4 g/100 g MS est l'un des plus élevés parmi les fruits frais, ce qui donne à la pulpe sa consistance légèrement gélatineuse (facilitent la "prise" de préparations comme des gelées ou des confitures confectionnées à partir de goyave).

Le Tableau I regroupe la composition nutritionnelle de la goyave mûre.

**Tableau I** : Composition nutritionnelle de la goyave (**Dignan et al., 2004**)

Composant	Eau (g)	Energie (kcal)	Glucides (g)	Protéines (g)	Lipides (g)	Fibre (g)
	87	31	3,5	0,7	0,5	5,4

Par ailleurs, la goyave se caractérise par une teneur exceptionnelle en vitamine C : 240 mg en moyenne pour 100g MS ; cette teneur situe la goyave largement en tête de l'ensemble des

fruits frais commercialisés, elle est 4 à 5 fois supérieure à celle des agrumes, et 2 à 3 fois plus élevée que celle du cassis ou du kiwi. Les autres vitamines de la goyave sont présentes à des taux beaucoup plus classiques pour un fruit frais, en particulier les vitamines B1 (0,03 mg), B2 (0,04 mg). On peut noter cependant une teneur relativement élevée en vitamine B3 qui atteint 1mg, une valeur supérieure à celle de la plupart des fruits frais. La teneur en vitamine A est de l'ordre de 0,36 mg (**Dignan et al., 2004**).

La goyave fournit un très large éventail de minéraux, elle est pourvue en potassium (150 mg aux 100 g MS), comme le sodium n'est que très faiblement représenté (4 mg aux 100 g MS), la goyave possède un rapport potassium /sodium particulièrement élevé, ce qui lui donne de réelles propriétés diurétiques. La goyave renferme des quantités non négligeables de calcium (10 mg aux 100 g MS) et de magnésium (12 mg). On y trouve aussi différents oligo-éléments, notamment du fer (0,2 mg aux 100 g MS) et du zinc (0,1 mg) (**Dignan et al., 2004**).

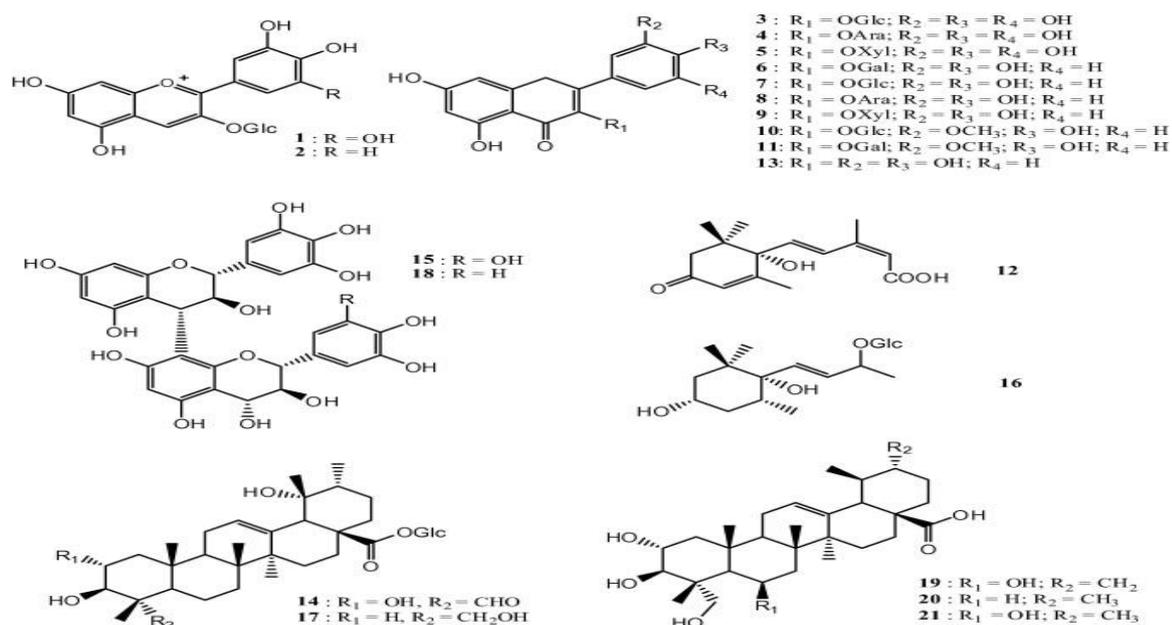
Le Tableau II regroupe quelques informations sur les compositions chimiques en minéraux et vitamine de la goyave mûre.

**Tableau II :** Composition chimiques de la goyave en minéraux et vitamine (**Dignan et al.,2004**)

Composant (mg/100g MS)	Zn	Fe	Na	Mg	K	Ca
	0,1	0,2	4	12	150	10
Composant (mg/100g MS)	Vit. C	Vit. A (Carotène)	Thiamine (Vit.B1)	Riboflavine (Vit. B2)	Niacine (Vit. B3)	Vit. E
	240	36	0,03	0,04	1,0	1,2

## 6. Antioxydants :

Une étude sur 7 variétés de fruits du goyavier a montré que les fruits contiennent des composés (Figure 3) tels que les anthocyanines (delphinidin-3-O-glucoside et cyanidin-3-O-glucoside), ainsi qu'une dizaine de flavonoïdes (myricetine-3-O-arabinoside, myricetine-3-O-xyloside, isorhamnetine-3-O-galactopyranoside, quercétine et isorhamnetine). On retrouve, également, des proanthocyanidines (gallocatéchine-(4a-8)-gallocatéchol, gallocatéchine-(4a-8)-catéchine), des sesquiterpénoïdes (acide abscisique et turpinionosides A), des triterpènes (pinfaensine, pedunculoside, acide guavenoïque, acide madécassique et acide asiatique). Le fruit qui n'est pas mûr est riche en tannins et astringent. Il a tendance à constiper (Flores et al., 2015). La peau du fruit contient principalement de la vitamine C (**Jain et al., 2003**).



**Figure 3** : Structures chimiques des différents composés retrouvés dans *Psidium guajava* L (Flores et al., 2015).

D'après la littérature, La goyave est riche en tanins, phénols, triterpènes, flavonoïdes, huiles essentielles, saponines, caroténoïdes, lectines, vitamines, fibres et acides gras (Joseph, 2011). Le Tableau III regroupe quelques informations sur les antioxydants de la goyave.

**Tableau III** : Les antioxydants de la goyave

Antioxydants	Teneurs	Références
Caroténoïdes (mg/100g MS)	1,53	(Joshi et al.,2017)
Vitamine C (mg/100gMS)	491,6	(Ellong et al.,2015)
CPT (mg EAG/100gMS)	422,7	(Ellong et al.,2015)
Flavonoïdes (mg EQ/100gMS)	594	(Lin et Yin ,2012)

MS : Matière Sèche, CPT : Composés phénoliques totaux

## 7. Utilisations et avantages de *P. guajava* L.

La goyave est considérée comme un super fruit gorgé en vitamine C (240 mg /100g de fruit). Le fruit est consommé comme fruit frais ou industrialisé en différents produits tels que : des jus, nectar, pâte, purée concentrée, confiture, gelée, barres de sucrerie, gélatine, la confiserie, etc... (**Jiménez-Escrig et al., 2001 ; Gutiérrez et al., 2008**).

En Thaïlande, une poudre peut être faite à partir de fruits immatures séchés et broyés, puis, on réalise une décoction. Pour un effet plus doux, le fruit immature peut être mangé frais, trempé dans un mélange de sucre, sel et poudre de chili. Enfin, le fruit immature peut être pressé puis bu avec une pincée de sel. La goyave contribue à soutenir le système de défenses et à maintenir l'organisme en forme, c'est pour ça, elle est utilisée dans la production de plusieurs formes de compléments alimentaires tel que « Arkovital® Pur'Énergie » qui est recommandé en cas de surmenage ou de fatigue passagère, pour la reprise du sport ou lors des changements de saison et qui aide à garder la forme et la vitalité. Selon deux études cliniques, la goyave possède un effet cardiovasculaire. La première a été faite sur deux groupes de patients suivis pendant 12 semaines. Chaque groupe a reçu un extrait de fruit de goyave avant chaque repas. A la fin de l'expérience, près de la moitié des patients présentent une diminution du cholestérol total sérique, des triglycérides et de la pression sanguine. La deuxième étude a été réalisée sur 145 patients hypertendus. Après 4 semaines, la pression artérielle ainsi que les taux de cholestérol et de triglycérides ont diminué dans le groupe ayant intégré la goyave dans leur régime alimentaire par rapport au groupe ayant gardé son alimentation classique (**Guillouty, 2016**).

Les écorces et les racines sont utilisées contre les diarrhées et les douleurs stomacales par utilisation d'une décoction. Cet usage est retrouvé au Panama et au Venezuela (**Gutiérrez et al., 2008**).

L'effet de l'extrait éthanolique de l'écorce de tige a été évalué sur des rats ayant une glycémie normale et d'autres ayant une hyperglycémie induite. Il apparaît que cet extrait provoque une hypoglycémie significative dans le groupe ayant une hyperglycémie induite (**Guillouty, 2016**).

Une étude a montré que l'extrait aqueux de la plante entière apporte une protection contre la mitomycine C, l'acide nalidixique et le peroxyde d'hydrogène, qui sont connus pour être génotoxiques, ce qui montre un effet antigénotoxique et antimutagénique (**Bartolome et al., 2006**).

Les fleurs sont utilisées comme cataplasme pour la conjonctivite (**Joseph, 2011**).

*Les antioxydants des feuilles  
de goyavier*

## 1. Les antioxydants des feuilles du goyavier

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Macheix et al., 2005**). Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (**Berger, 2006**).

Les analyses histochimiques et phytochimiques ont montré que les feuilles du goyavier sont riches en plusieurs composés tels que les flavonoïdes, tanins, phénols, triterpènes, saponines, caroténoïdes, lectines, vitamines, fibres et acides gras, résines, glycosides (**Baby, 2011 ; Gutierrez et al., 2008**).

Le tableau ci-dessous résume quelques antioxydants majeurs des feuilles du goyavier.

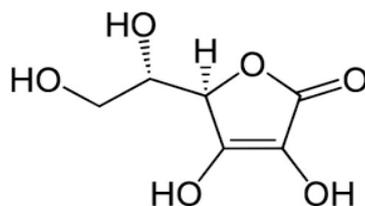
**Tableau IV** : Les antioxydants des feuilles du goyavier

Antioxydants	Teneurs	Références
Vitamine C (mg/100g MS)	25	(Nwozo et al.,2014)
Tannin (mg/g MS)	3,81	(Mailoa et al.,2103)
Flavonoïde (mg/g MS)	5,03	(Nantitanon et al.,2010)
Caroténoïde (mg/g MS)	8	(Krishnaveni et al.,2013)
CPT (mg EAG/g MS)	575,3	(He, Q et Venant,2004)

### 2.1 Acide ascorbique (Vitamine C)

L'acide ascorbique (Figure 4) est le principal antioxydant de la troisième ligne de défense. En effet, il peut capter à la fois les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (**Marafk, 2003**). De plus, lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, l'acide ascorbique passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyle), qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (**Gulçin, 2012**).

La teneur des feuilles du goyavier en vitamine C est de 25 (mg/100 g MS), elle est largement en dessous de celle du la goyave (le fruit) (**Nwozo et al., 2014**).



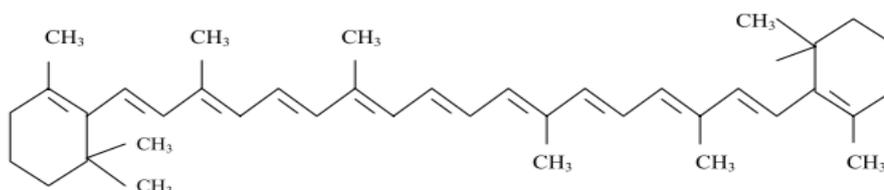
**Figure 4** : Structure de l'acide ascorbique

## 2.2 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des colorants naturels synthétisés par les plantes et sont responsables des couleurs lumineuses de divers fruits et légumes (orange, rouge et jaune). Différents types de caroténoïdes (alpha-carotène, bêta-carotène, la lutéine, lycopène, etc.) dont la plupart de ces derniers ont l'activité antioxydante. Le bêta-carotène (Figure 5) est le majeur caroténoïde commun en fruits et légumes (San et al., 2010).

Les caroténoïdes sont trouvés dans les organismes photosynthétiques en raison de leurs propriétés photoprotectrices et antioxydantes reconnues. Les caroténoïdes appartiennent aux isoprénoïdes et leur structure de base est composée de huit unités d'isoprène ce qui donne un squelette C<sub>40</sub>. Les caroténoïdes prédominants présents sont le  $\beta$ -carotène, le lycopène, la lutéine, la  $\beta$ -cryptoxanthine et l' $\alpha$ -carotène (Sugiura, 2013).

Une étude a été réalisée sur les feuilles de différentes plantes a révélé que les feuilles de goyavier présentent une teneur de 8 mg /g en caroténoïde (Krishnaveni et al., 2013).



**Figure 5** : Structure chimique du  $\beta$ -carotène

## 2.3 Les composés phénoliques totaux

Les composés phénoliques sont l'un des groupes de substances largement répandues dans le règne végétal avec plus de 8000 structures. Ils sont présents dans tous les organes de la plante et leurs synthèses résultent de deux voies principales : la voie de shikimate et celle d'acétate (Barone et al., 2009).

L'élément structural de base de ces molécules est un noyau benzéique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique.

(éther, méthylique, ester, sucre...). Plusieurs fonctions ont été attribuées à ces composés ; chez les végétaux, ils participent aux processus de défense contre les pathogènes et les herbivores, comme ils sont responsables de la pigmentation des fleurs, des fruits et des légumes, etc. (Bennik, 2004).

L'extrait de poudre de feuille du goyavier présente un remarquable taux de phénols totaux de 575, 3mg EAG/g MS (He,Q et Venant, 2004).

### 2.3.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (Figure 6) constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Ils sont rencontrés dans les fruits, les légumes et certaines boissons. Des remèdes à base de plantes renfermant des flavonoïdes ont été utilisés en médecine traditionnelle de par le monde (Ghedira, 2005).

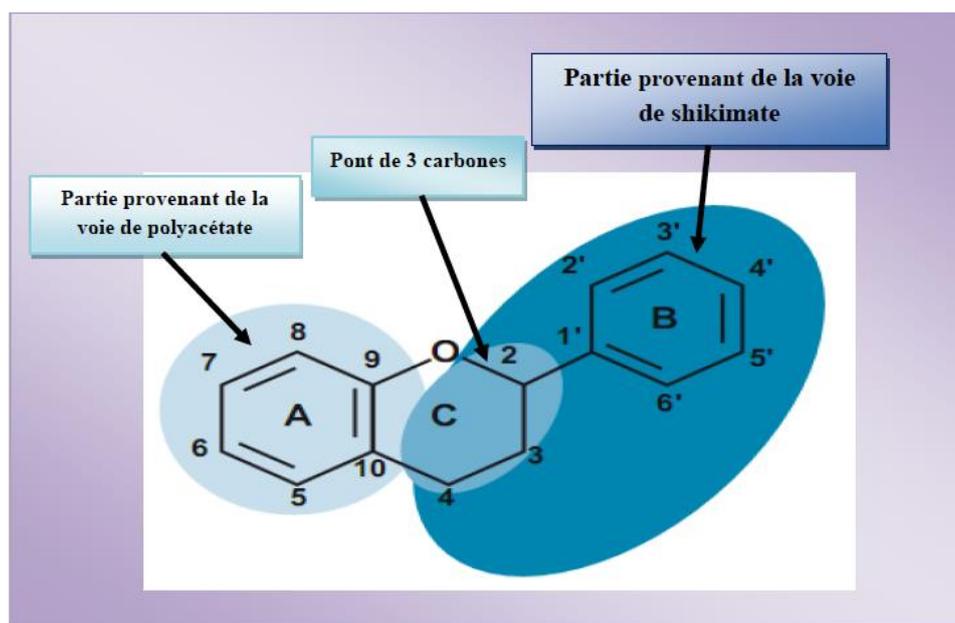


Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes (Ghedira, 2005).

Les flavonoïdes ont une structure de base sous forme de C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub> cette structure est le produit des deux voies de synthèse des composés phénoliques. Les différents types de flavonoïdes retrouvés dans une huile essentielle extraite des feuilles du goyavier sont : myricétine, quercétine, luteoline et kaempférol. La plus forte concentration de ces flavonoïdes a été retrouvée dans les feuilles matures au mois de juin (Manikandan et Vijaya ,2015).

La teneur en flavonoïde d'un extrait aqueux des feuilles de goyavier est de 180,77mg/g et de 239,45mg/g pour un extrait acétonique (Camarena-Tello et al., 2018).

### 2.3.2 Les tannins

Les propriétés des tannins leur confèrent un intérêt important dans les procédés de fabrication et de conservation des produits alimentaires, mais aussi dans les propriétés organoleptiques de ces produits (Derbel et Ghedira, 2005).

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tannins (Figure 7) différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique :

#### ➤ Les tannins hydrolysables

Ce sont des oligo--esters ou des polyesters d'un sucre ou d'un polyol apparenté et d'un nombre variable de molécules d'acide gallique dans le cas des tannins galliques, soit d'acide hexahydroxydiphénique ou ses dérivés d'oxydation (déhydrohexahydroxydiphénique ; acide chébulique) dans le cas des tannins ellagiques (Derbel et Ghedira, 2005).

#### ➤ Les tannins condensés

Ce sont des polymères flavaniques, constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent (4-8) ou (4-6) (Derbel et Ghedira, 2005).

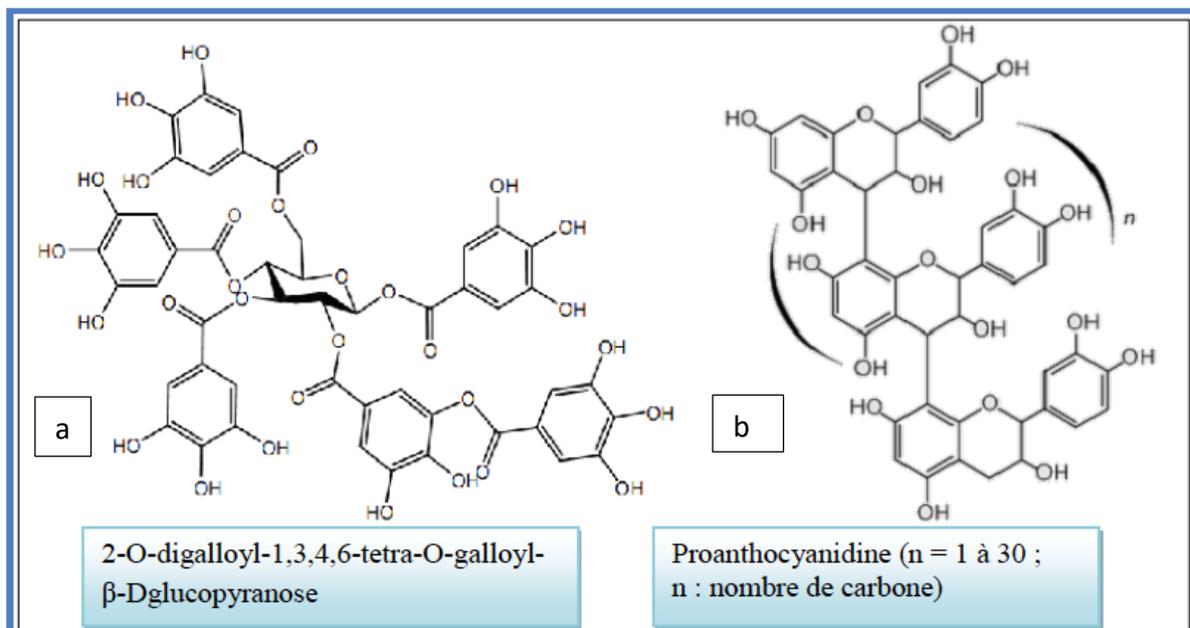
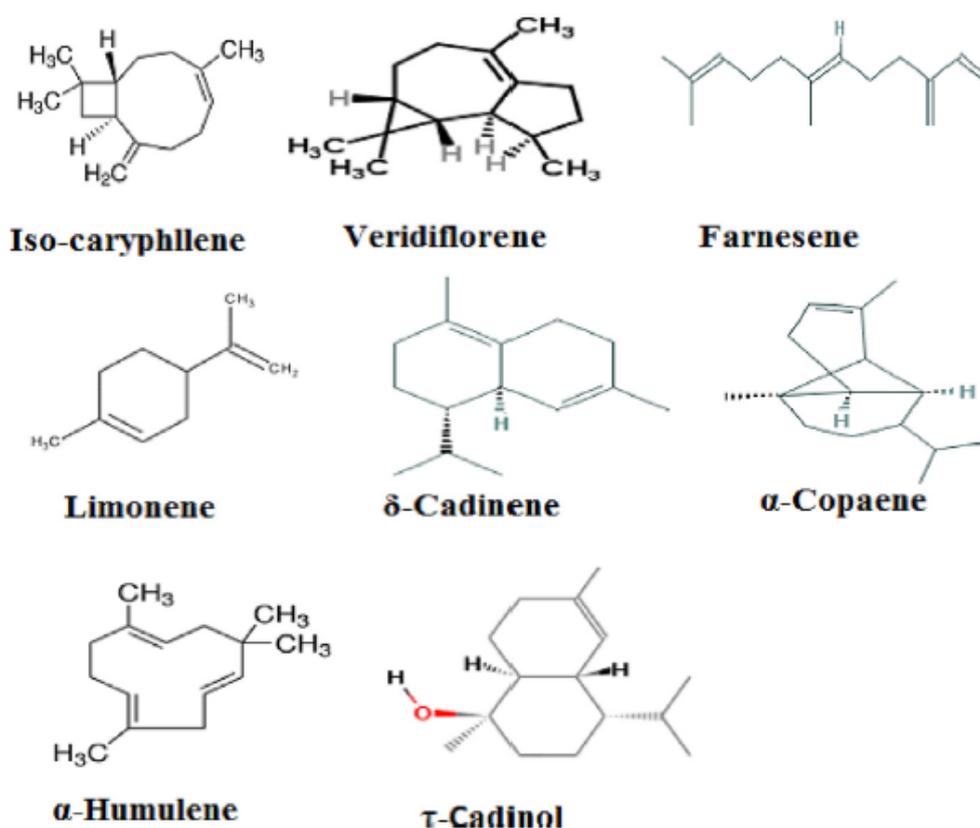


Figure 7 : Structure d'un tannin hydrolysable (a) et d'un tannin condensé (b) (Bruneton, 1999).

Toutes les parties du goyavier sont riches en tanins et la teneur en tannin d'un extrait aqueux de feuilles du goyavier est de 3,46 (mg/g) et de 3,81(mg/g) pour un extrait méthanolique (Venkatachalam et al., 2012).

### 3. Composition chimique des feuilles du Goyavier

Dans une récente étude sur une huile fraîche extraite des feuilles du goyavier par la méthode d'hydrodistillation, (Weli et al.,2018) ont pu identifier cinquante-quatre composés, les principaux composants chimiques détectés dans l'huile de feuilles étaient (Figure 8) : isocaryophyllène (33,53%), veridiflorene (13,00%), farnésène (11,65%), limonène (9,84%), cadinène (1,75%),  $\alpha$ -copaene (2,80%),  $\alpha$ -humulène (3,74%), aromadendène (1,70%) et scadinol (0,08%).



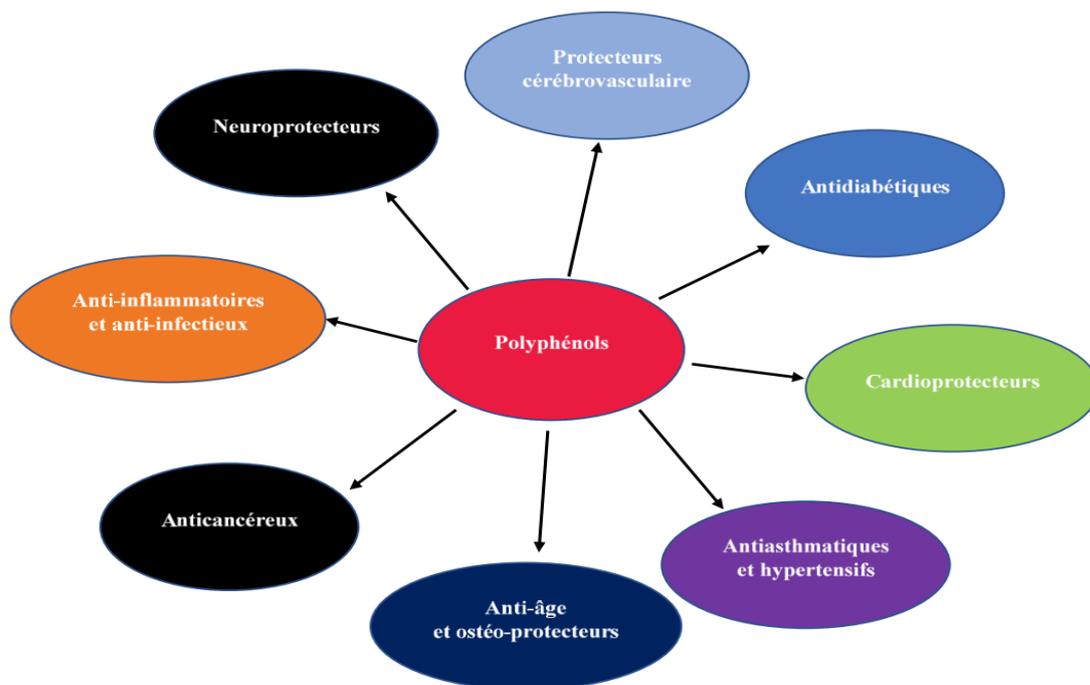
**Figure 8** : Structures chimiques des principaux composés d'huile essentielle des feuilles de P. guajava (Weli et al., 2018)

#### 4. Autres composants des feuilles du goyavier

De nombreuses molécules ont été retrouvées dans une huile essentielle extraite des feuilles du goyavier notamment :  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, limonène, menthol, terpenyl acétate, alcool isopropyl, longicyclène, caryophyllène,  $\beta$ bisabolène, cinéol, caryophyllène oxyde,  $\beta$ -copanène, farnésène, humulène, selinène, cardinène et curcumène, des saponines, également, ont été isolés des feuilles, ainsi que des acides triterpéniques (Manikandan et al, 2015).

#### 5. Rôles des antioxydants

Les composés phénoliques attirent de plus en plus l'attention en tant qu'agents potentiels pour la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif. Au cours des deux dernières décennies, les composés phénoliques ont été largement étudiés et plusieurs bioactivités de ces composés ont été relevées. Ce sont des antioxydants qui ont plusieurs propriétés biologiques (Figure 9): antidiabétique, anticancéreuse, anti-inflammatoire, cardioprotectrice, antivirales antiasthmatique, antiseptique, hépato-protecteur, antifongique, antibactériennes, antivirales etc. Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{HO}\bullet$ ) et superoxyde ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) mais aussi à leur affinité pour une grande variété de protéines dont certains enzymes et récepteurs (Kumar et Pandey, 2013).



**Figure 9** : Propriétés biologiques et thérapeutiques des polyphénols (Kumar et Pandey, 2013)

## 6. Effets thérapeutiques des feuilles du goyavier

Les feuilles du goyavier sont utilisées depuis la nuit des temps pour des fins thérapeutiques que les chercheurs ont confirmé cette utilisation après des innombrables études.

### 6.1 Effet antitumoral et anticancéreux

Un extrait aqueux de feuilles de *P. guajava* a montré une diminution dose-dépendante de la viabilité de la lignée tumorale prostatique DU-145. En effet, à 1,0 mg/ml, l'extrait a permis de réduire la viabilité à 36,1% après 48h et à 3,6% après 72h d'incubation (**Chen et al., 2007**).

L'huile essentielle extraite à partir des feuilles de *P. guajava* est révélée être fortement efficace pour réduire la croissance du carcinome épidermique de bouche humaine et des variétés de cellule murines de la leucémie (**Conforti et al., 2005**).

### 6.2. Effet Antimicrobien

Une forte action microbienne de l'extrait de feuilles de *P. guajava* (aqueuse et méthanolique) a été observée contre la bactérie de l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* et de l'élastase de neutrophile l'humain (HNE). L'extrait a également montré une activité antimicrobienne in vitro (*E. coli*, le mirabilis de salmonella, de *S. aureus*, Proteus et le dysenteria de Shigella) (**Gnan et Demello, 1999**).

### 6.3. Effet antidiarrhéique

Une dose de 0,2 ml/kg de feuilles fraîches montre une diminution de 65% des mouvements intestinaux en comparaison à la morphine qui est connue pour ses propriétés anti sécrétoires au niveau intestinal. Cette activité antidiarrhéique semble due à la diminution des sécrétions aqueuses retrouvées au cours des diarrhées. Les extraits méthanoliques ont un effet préventif sur les diarrhées causées par *E. coli* ou par le Rotavirus, qui font partie des principales causes des diarrhées, car ils empêchent l'adhésion de ces microorganismes à la paroi intestinale. L'utilisation des feuilles dans le traitement des diarrhées induites par des microorganismes est aussi justifiée par l'effet antibactérien de *P. guajava* L. qui a été démontré sur différentes bactéries et notamment *Streptococcus mutans* et *E. coli*. (**Gutiérrez et al., 2008**).

#### 6.4. Effet hypoglycémiant

En Chine, une étude multicentrique randomisée a mis en évidence l'effet sur la glycémie de *P. guajava* L. sur des patients d'âge moyen de 59,6 ans diabétiques depuis 5 et 4 ans. Ils ont reçu des capsules contenant 500 mg d'extrait aqueux de feuilles de goyavier. Les résultats montrent une hypoglycémie mais qui est moindre par rapport à la chlorpropamide et à la metformine. *P. guajava* L. pourrait donc être utilisé dans la prévention du diabète (**Chang,1982**).

#### 6.5. Effet antidiabétique

L'administration de l'extrait aqueux des feuilles de *P. guajava* pour 30 j a révélé une diminution significative en glucose de sang, urée, glycogène de foie de poids corporel et cholestérol dans le sérum. Il a été observé que l'inhibition d'alpha-glucosidase qui a ralenti (chez les souris) la digestion de l'hydrate de carbone (**Maurya et al., 2004**).

#### 6.6. Effet Antiinflammatoire

*P. guajava* a été employé traditionnellement contre des perturbations gastrointestinales et des maux respiratoires. L'inhibition de la lipoxigénase par l'huile essentielle des feuilles expliquent rationnellement leur utilisation pharmacologique sous forme d'inhalation d'améliorer plusieurs maux supérieurs de région respiratoire liés à l'inflammation (**El-Ahmady et al., 2013**).

#### 6.7. Gastroentérites infantiles dues au rotavirus

Une étude a été menée dans un hôpital chinois, où une décoction de feuilles de goyavier a été donnée à 62 enfants atteints de diarrhée due à rotavirus. La durée des symptômes, le taux sanguin de sodium et le taux de conversion négative de l'antigène antirotavirus humain (HRV) ont été comparés avec un traitement classique. Au bout de trois jours, le taux de récupération des individus traités était de 87,1% alors qu'il était de 58,1% pour le groupe témoin. La durée de symptômes était significativement écourtée avec le traitement par *P. guajava* L. Enfin, le taux de conversion négative de l'antigène était également plus élevé dans le groupe traité par l'extrait étudié. Le traitement par le goyavier est donc une bonne alternative pour le traitement des diarrhées infantiles du au rotavirus (**Guillouty, 2016**).

### 6.8 Effet hépatoprotecteur

Un extrait aqueux de feuilles a été étudié sur des foies de rats ayant subi des altérations par l'administration de cholestérol, de lipides, de transaminases. Des extraits de feuilles à 500 mg/kg ont montré une significative hépatoprotection. L'effet hépatoprotectif et antioxydant de l'extrait aqueux de feuilles de *P. guajava* chez des rats albinos de Wistar est bien étudié et soutenu par l'histopathologie. L'extrait aqueux des feuilles de la plante, possède une activité hépatoprotective intéressante. En effet, l'induction de dommages des cellules de foie saines a indiqué les propriétés hépatoprotectives des extraits de feuilles (Chen et al., 2011)

### 6.9. Effet cardioprotecteur

Une étude réalisée sur des cœurs isolés de rats a montré qu'un extrait aqueux de feuilles de *P. guajava* L. apportait un effet cardioprotecteur sur les dommages causés par l'ischémie et la reperfusion myocardique. Un extrait aqueux de feuilles de *P. guajava* a réduit de manière significative les phosphates et le malondialdéhyde (MDA) responsables de dommages myocardiques. Il a été également observé que l'extrait éthanolique aqueux des feuilles empêchait le dégagement intracellulaire de calcium. Il permet donc la prévention des maladies cardio-vasculaires, puisque son utilisation traditionnelle dans l'hypertension est bien établie (Conde et al., 2003).

### 6.10. Effet antitussif

Une étude testant un extrait méthanolique des feuilles de *P. guajava* L. rapporte la diminution de la fréquence des quintes de toux, causées par des aérosols de capsaïcine par rapport à un groupe témoin. Sur des trachées isolées de rat, cette même étude rapporte une diminution de la contraction des muscles ce qui traduit une action antitussive des feuilles (Gutiérrez et al., 2008).

### 6.11 Autres effets

En Uruguay, les décoctions de feuilles servent à nettoyer le vagin et l'utérus lors d'apparition de leucorrhées (Gutiérrez et al., 2008). On retrouve une autre utilisation pour lutter contre les troubles menstruels et dans les cas de stress chronique ou d'anxiété (Argueta et al., 1994).

# *Partie expérimentale*

# *Matériel et méthodes*

## 1. Matrice végétale

### 1.1. Choix de la matrice

Le choix de cette matrice (les feuilles du goyavier), réside dans leurs pouvoirs thérapeutiques suite aux nombreuses utilisations traditionnelles dans beaucoup de régions du monde et qui ont été confirmées par plusieurs études de recherches (chapitre II). Les bienfaits de ces feuilles restent, malheureusement, ignorés auprès de notre population.

### 1.2. Récolte et séchage

Afin de réaliser notre étude, les feuilles de l'espèce *Psidium guajava L* ont été récoltées en Mars 2019, chez un particulier spécialisé.

Les feuilles récoltées ont été nettoyées afin d'éliminer toutes traces de poussières, puis elles ont été séchées à l'air, à une température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite, les feuilles ont été transférées à l'étuve à 40°C pendant 48 h pour affiner le séchage et obtenir un meilleur broyage. La figure 10 représente les feuilles après séchage.



Figure 10 : Photographie des feuilles séchées du goyavier

### 1.3. Broyages et tamisage

Après séchage, la matrice végétale (feuilles) destinée à l'extraction des composés phénoliques a été broyée séparément à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre (Figure 11). Cette dernière a été par la suite tamisée à l'aide d'un tamiseur pour retenir une granulométrie de 250 µm. La poudre obtenue a été conservée dans un flacon en verre opaque et stockée à l'abri de la lumière à température ambiante.



Figure 11 : Photographie de la poudre des feuilles séchées du goyavier

## 2. Test d'humidité

Selon **Afroze et al. (2009)**, la teneur en eau a été déterminée par dessiccation de 1 g de poudre de feuilles dans une étuve à une température de 105°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante de l'échantillon, le taux d'humidité H (%) est calculé selon la formule suivante :

$$H (\%) = \frac{P_{av} - P_{ap}}{PE} \times 100$$

Où :

H (%) : Taux d'humidité en pourcentage.

Pav : Poids de l'échantillon avant séchage (g).

Pap : Poids de l'échantillon après séchage (g).

PE : Poids de la prise d'essai (g).

## 3. Extraction des composés phénoliques totaux

La poudre obtenue a été soumise à une extraction par macération selon la procédure décrite par **Al-Farsi et al. (2005)**, une prise d'essai de la poudre de feuille du goyavier (1g) a été mise en contact avec 10 ml de solvant d'extraction (éthanol, méthanol, acétone, eau distillé) dans un bécher et subit une agitation mécanique pendant un temps donné à une température donnée, à l'abri de la lumière. Le mélange a été filtré sur papier Wattman. Les extraits obtenus ont été conservés au congélateur.

## 4. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques

L'optimisation des paramètres d'extraction des composés phénoliques est une méthode dans laquelle des paramètres initiaux sont fixés et modifiés l'un après l'autre suivant une succession bien déterminée pour qu'on puisse déterminer en final les paramètres optimaux qui permettent d'obtenir de meilleur rendement d'extraction et d'activité antioxydante. Les paramètres fixés au départ sont résumés dans le tableau (Annex I).

Le choix du paramètre adéquat est déterminé selon la teneur en composés phénoliques totaux extraite et de l'activité antiradicalaire (DPPH).

#### 4.1. Optimisation de la nature du solvant d'extraction

Afin de déterminer quel solvant permettant d'obtenir une meilleure extraction des composés phénoliques de la poudre des feuilles du goyavier, une série d'extraction est réalisée avec quatre solvants (éthanol, méthanol, acétone, eau distillée). Pour ce faire, 1 g de poudre a été dissous dans 10 ml de solvant à 50% avec agitation pendant 2 h à 20°C à l'abri de la lumière. Après filtration sur papier Wattman. Les extraits obtenus ont été conservés au congélateur.

A la fin de cette opération, on obtient l'extrait correspondant, dont le rendement est déterminé par la formule suivante :

$$R(\%) = [(P1-P0) / PE] \times 100$$

Où :

R (%) : Rendement

P0 : Poids de la boîte vide (g).

P1 : Poids de la boîte après évaporation (g).

PE : Prise d'essai d'échantillon (g).

#### 4.2. Optimisation de la concentration du solvant d'extraction

Ce test avait pour but de fixer la concentration du solvant jugé plus performant que les autres solvants. Il consiste à mélanger 1 g de poudre de feuilles de goyavier dans 10 ml du solvant optimisé (éthanol) à différentes concentrations (15%, 30%, 45%, 60%, 75%, 95% et 100%) dans les mêmes conditions décrites précédemment.

#### 4.3. Optimisation de ration (variation de la quantité de la matrice)

Différents poids de poudre des feuilles de goyavier (0,5 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 2,5 g, et 3 g) ont été étudiés. Chacun a été mélangé avec 10 ml d'éthanol 45% jugé meilleure concentration dans le précédent test. Les mélanges obtenus ont subi des agitations mécaniques pendant les mêmes conditions décrites précédemment.

#### 4.4. Optimisation de ration (variation de volume du solvant)

Des différents volumes de solvant (10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml 90 ml et 100 ml) ont été étudiés. La poudre de feuilles (1 g) mélangé dissous dans l'éthanol à 45% ont été mis dans les mêmes conditions décrites précédemment et les extraits obtenus ont servis pour effectuer les mêmes analyses citées ci-dessous.

#### **4.5. Optimisation de la température d'extraction**

Afin déterminer la température idéale laquelle, le rendement de composés phénoliques totaux et l'activité antiradicalaire sont meilleurs, le protocole suivant a été adopté : 1 g de matrice dissous dans 10 ml d'éthanol à 45% ont été incubés à différentes températures (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C et 80°C) pendant 2 h à l'abri de la lumière et sous agitation magnétique.

#### **4.6. Optimisation du temps d'extraction**

Le temps d'extraction peut influencer le taux d'extraction des composés phénoliques ainsi que leur activité, afin de vérifier cela, 1 g de poudre des feuilles du goyavier a été mélangé avec 10 ml d'éthanol à 45% durant différentes périodes de temps (1 h, 2 h, 4 h, 6 h et 12 h) à 20°C (Température optimale) à l'abri de la lumière.

#### **4.7. Optimisation du nombre d'extraction**

Afin de déterminer si le nombre d'extraction influence le taux d'extraction des composés phénoliques ainsi que leur activité antiradicalaire, 1 g de poudre des feuilles de goyavier a été mélangé avec 10 ml d'éthanol à 45% à 20°C pendant 2 h (temps optimal) à l'abri de la lumière. Le mélange a été ensuite filtré, le culot obtenu a subi une autre extraction dans les mêmes conditions que la première. Cette opération a été répétée trois fois. Les filtrats ont été conservés au congélateur.

### **5. Dosage des antioxydants**

#### **5.1. Dosage des composés phénoliques totaux**

##### **❖ Principe**

Le Folin-Ciocalteu qui est un mélange de couleur jaune constitué de deux acides phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). En milieu basique (carbonate de sodium), le réactif de Folin-Ciocalteu est réduit lors de l'oxydation des composés phénoliques, en un mélange d'oxydes de tungstène et de molybdène, la coloration bleu (absorbe aux environs de 750-765 nm) produite est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques contenue dans l'extrait (Marian et Fredon, 2004).

### ❖ Mode opératoire

La teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait a été estimée selon la méthode décrite par **Alimi et al. (2011)**. Un volume de 2 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 %) a été additionné de 100  $\mu\text{L}$  de chaque extrait (avec dilution convenable). Après agitation et incubation pendant 2 min à température ambiante, 100  $\mu\text{L}$  de réactif Folin-Ciocalteu dilué (50/50 v/v) ont été ajoutés au mélange. L'ensemble des préparations ont été par la suite incubées à l'obscurité pendant 30 min. La lecture des absorbances a été réalisée grâce au spectrophotomètre contre un blanc à 760 nm.

La concentration en composés phénoliques de l'extrait, exprimée en mg équivalent d'acide gallique mg (EAG)/g de la matière sèche, est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique (Annexe II).

## 5.2. Dosage des flavonoïdes

### ❖ Principe

La coloration jaunâtre donnée dans cette méthode est dû à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (**Lagnika, 2005**).

### ❖ Mode opératoire

Le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué selon la méthode décrite par **Djeridane et al. (2006)**, un volume de 1mL d'extrait (avec dilution convenable) a été ajouté à 1 ml d'une solution d' $\text{AlCl}_3$  (2%). Après 15 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée contre un blanc à 430 nm.

La teneur en flavonoïdes, exprimée en mg d'équivalent de quercétine (EQ) /g de matière sèche, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec de la quercétine (Annexe III).

## 5.3. Dosage des tanins condensés (proanthocyanidines)

### ❖ Principe

La teneur en proanthocyanidines a été déterminée par la méthode du butanol HCl, c'est une méthode colorimétrique qui implique le clivage oxydatif des proanthocyanidines avec le sulfate ferreux, faisant apparaître une coloration rouge proportionnelle à la quantité des proanthocyanidines (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

### ❖ Mode opératoire

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par **Wilfred et Nicholson (2006)**. Un volume de 2,5 ml de la solution de sulfate de fer acide ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ -butanol-HCl) a été prélevé et additionné à 250  $\mu\text{L}$  de chaque extrait. Après agitation, le mélange a été laissé agir sous incubation à l'obscurité dans un bain marie à 95°C pendant 50 min. La lecture de l'absorbance a été réalisée par spectrophotomètre contre un blanc à 530 nm.

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent cyanidine par gramme de matière sèche (mg EC/g MS). La formule adoptée pour de calcul de la teneur des tanins dans les extraits est la suivante :

$$C = (\text{Abs} \times M \times D) / \epsilon \times L$$

**Avec :** **D** : Facteur de dilution

$\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire (34700 mol/cm.l)

**L** : Chemin optique (1cm)

**Abs** : Absorbance de l'échantillon

**M** : Masse molaire de la cyanidine (g/mol)

**C** : Concentration (g/L)

## 5.4. Dosage des caroténoïdes

### ❖ Principe

La couleur est l'élément caractéristique de caroténoïdes, elle peut varier du jaune au rouge. Leur couleur est due à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et permettant ainsi l'absorption de la lumière visible entre 400 nm et 500 nm. Le degré de conjugaison du chromophore détermine les caractéristiques d'absorption du caroténoïde (**Degrou, 2013**).

### ❖ Mode opératoire

Les caroténoïdes ont été extraits par la méthode de **Sass-Kiss et al. (2005)**. Un volume de 10 ml du mélange de solvant d'extraction (Hexane/acétone/ éthanol, 2/1/1 (v/v/v)) ont été ajoutés à 1 g de poudre de feuille de goyavier. Après agitation à l'obscurité pendant 30 min, une centrifugation immédiate a été effectuée à 5000 tours/pendant 15 min. Le surnageant (phase hexanique) a été récupéré puis dilué pour mesurer son absorbance à 450 nm.

Les concentrations en caroténoïdes sont estimées en se référant à la courbe d'étalonnage en utilisant le  $\beta$ -carotène comme standard (Annexe IV). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent  $\beta$ -carotène par gramme de matière sèche (mg E $\beta$ -C/g MS).

## 6. Activités antioxydante

### 6.1. Inhibition du DPPH (pouvoir antiradicalaire)

#### ❖ Principe

Le DPPH est un radical libre organique stable, généralement utilisé pour évaluer les propriétés antiradicalaires de toute substance in-vitro (**Bozin et al., 2008**).

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphenyl-1- picrylhydrazyl) de couleur violette (forme oxydé) se réduit en 2,2 Diphenyl-1- picryl hydrazine de couleur jaune (**Popovici et al., 2009**). L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre à 517 nanomètres, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire des composés dont on souhaite déterminer l'activité (**Kouamé et al., 2009**).

#### ❖ Mode opératoire

Un volume de chaque extrait à différentes concentrations, a été mélangé avec 2,44 ml de solution de DPPH, préparé au préalable dans le méthanol ( $6 \times 10^{-5} \text{M}$ ). Les solutions ont été mélangées puis incubées à l'obscurité pendant 1 h. Un contrôle a été préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol. Les absorbances (Abs) ont été mesurées à 517 nm (**Brand-Williams et al., 1995**). Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH (%) est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs contrôle}} \times 100.$$

D'après les courbes de régression (%d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations d'extrait obtenu après optimisation des paramètres cités ci-dessus) la concentration permettant d'inhiber le radical DPPH de 50 % (IC50) a été déterminée.

## 6.2. Pouvoir réducteur

### 6.2. 1.Réduction du phosphomolybdate (PMB)

#### ❖ Principe

Le test du pouvoir réducteur phosphomolybdate est un essai direct qui est employé principalement pour mesurer la puissance des antioxydants non enzymatiques. Il repose sur la réduction des molybdates en molybdène en présence des extraits en donnant une coloration verte détectable par l'UV à une longueur d'onde de 695 nm (**Prieto et al., 1999**).

### ❖ Mode opératoire

Le test au phosphomolybdate a été réalisé selon la méthode décrite par **Prieto et al. (1999)**, un volume de 2,5 ml de réactif de phosphomolybdate a été additionné à 200 µL de chaque extrait. Après agitation, les échantillons ont été incubés pendant 1h 30 min dans un bain marie à 95°C. Les absorbances ont été mesurées à 695 nm.

Les EC<sub>50</sub> sont exprimées en mg/ml et sont calculées à partir de l'équation linéaire de la courbe tracée (les absorbances en fonction des concentrations).

## 6.2. 2.Réduction du chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>)

### ❖ Principe

Ce pouvoir mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique Fe<sup>3+</sup> (FeCl<sub>3</sub>) en fer ferreux Fe<sup>2+</sup> (FeCl<sub>2</sub>) en présence d'un agent chromogène ferricyanure de potassium K<sub>3</sub> [Fe (CN)<sub>6</sub>]. Ceci se traduit par le virage de la couleur jaune de ferricyanure de potassium vers une couleur bleu verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'antioxydant (**Chou et al.,2003**).

### ❖ Mode opératoire

Le pouvoir réducteur de l'extrait, obtenu après optimisation des paramètres étudiés, a été déterminé selon la méthode rapportée par **Ferreira et al. (2007)** ; un volume de 1,25 ml de tampon phosphate (pH 6,6) et un 1,25ml de ferrocyanure de potassium (K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>) ont été additionnés à 0,5 ml de chaque extrait. Après agitation, les échantillons ont été incubés pendant 20 min dans un bain marie à 50°C, puis 1,25ml de TCA (10%) ont été additionnés. Après une centrifugation immédiate effectuée à 650tours pendant 10 min, 1,25ml ont été prélevés du surnageant et 1,25ml d'eau distillé et 0,25ml FeCl<sub>3</sub>(1%) ont additionnés. Les absorbances ont été mesurées à 700 nm.

## 7. Analyse statistique

Toutes les données obtenues représentent la moyenne de trois essais. Les paramètres de la statistique descriptive (moyennes et écart types) ont été calculés à l'aide du programme Excel de Microsoft office 2013. L'analyse de la variance entre les différents échantillons étudiés est faite au test ANOVA-LSD du logiciel STATISTICA 5.0 à niveau de signification de 0,05.

## *Résultats et discussion*

## 1. Taux d'humidité

Dans le but d'estimer le rendement après séchage, il est nécessaire de connaître la teneur en eau de la matrice. Une humidité élevée induit la dégradation des antioxydants par le phénomène d'oxydation.

La teneur en humidité de la poudre de feuilles du goyavier étudiée est de 9,47 %. Cette valeur est plus faible à celle obtenue par **Afroze et al. (2009)** sur les feuilles de *P. guajava* récoltées au Bangladesh séchées sous air chaud entre 105°C-110°C, dont la valeur est égale à 15,35 %. Cette différence de taux d'humidité revient au mode de séchage de la matrice sur ses propriétés physico-chimiques ainsi qu'à l'origine géographique, la variété et le degré de maturité de la matrice.

## 2. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques totaux

L'extraction des composés phénoliques totaux (CPT) est exigeante, elle dépend de plusieurs facteurs tels que le type du solvant, la nature de la matrice végétale à extraire, la structure chimique des composés phénoliques, le temps d'extraction ainsi que la température qui peuvent influencer d'une manière significative l'extraction (**Buvi-Koji et al., 2011 ; Dent et al., 2013**).

### 2.1 Optimisation de la nature du solvant d'extraction

L'extraction dépend du type du solvant. Les solvants souvent utilisés pour l'extraction des CPT sont le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'eau, l'acétate d'éthyle, le propanol et leurs dérivés (**Noer et al., 2015**).

#### 2.1.1. Rendement des extraits de poudre de feuilles du goyavier

L'effet du type du solvant (méthanol, éthanol, acétone, eau) sur le rendement d'extrait obtenu à partir de la poudre de feuilles de goyavier après séchage à 105°C pendant 24h est présenté dans le tableau X.

**Tableau X:** Rendement des extraits de poudre de feuilles du goyavier selon le solvant testé

Solvant	Rendement (%)
Ethanol	3,50 ± 0,00 <sup>a</sup>
Méthanol	2,75 ± 1,06 <sup>c</sup>
Acétone	3,00 ± 0,71 <sup>b</sup>
Eau	3,00 ± 0,71 <sup>b</sup>

a, b, c : représentent les différences significatives à  $P \leq 0,05$ .  $a > b > c$ .

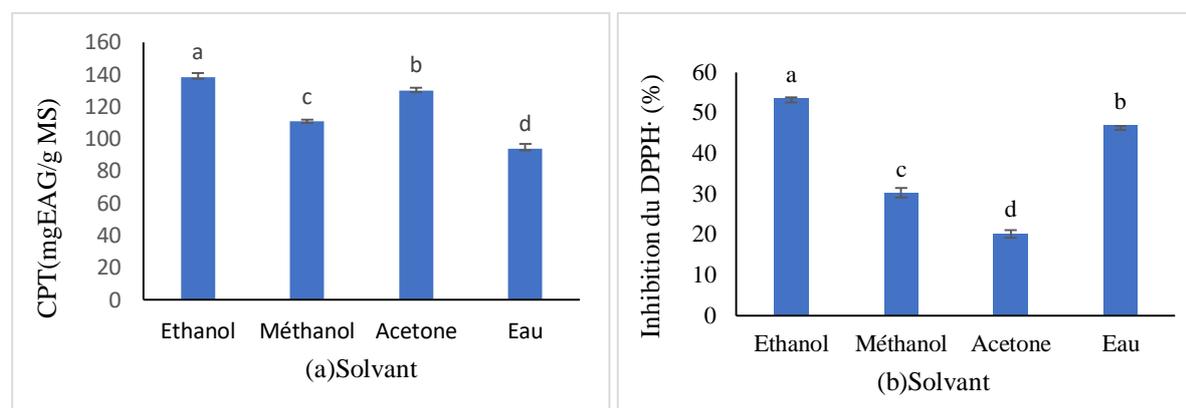
Le meilleur rendement d'extraction obtenu est celui de l'extrait éthanolique (3,50 %), suivi de celui des extraits acétonique et aqueux (3%), et enfin de l'extrait méthanolique avec 2,75%.

En comparaison avec le travail de **Mailoa et al. (2013)** réalisé sur la poudre du goyavier, d'Indonésie, par l'utilisation de deux solvants (éthanol et acétone), le meilleur rendement d'extraction est obtenu avec l'extrait éthanolique égale à 9,88% contre 8,16% pour l'extrait acétonique.

Un autre travail d'**Afroze et al. (2009)** réalisé sur la poudre du goyavier de Bangladesh, ont montré que parmi les deux solvants testés (méthanol, acétone), l'extrait aqueux a montré le meilleur rendement d'extraction avec 8,28% contre 5,6% pour l'extrait méthanolique. Ces différences dans le rendement varient d'une plante à une autre et en fonction du solvant utilisé, les conditions environnementales, la période de récolte et l'âge du matériel végétal peuvent influencer sur les rendements d'extraction.

### 2.1.2. Teneurs en composés phénoliques totaux

Les résultats obtenus de l'optimisation du solvant dans le cadre notre étude sont représentée dans la figure 12.



**Figure12 :** (a) : Teneurs en composés phénoliques totaux, (b) : Inhibition du DPPH $\cdot$  des extraits des feuilles de goyavier obtenus par différents solvants.  
a, b, c, d : représentent les différences significatives à  $P \leq 0,05$ .  $a > b > c > d$ .

La figure 12 (a) et (b) représente respectivement l'effet des différents solvants étudiés (méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'eau) sur le taux d'extraction des CPT et leur pourcentage d'inhibition du DPPH $\cdot$ . Elle montre clairement que le type de solvant a une influence significative à  $P \leq 0,05$ , que ce soit sur le taux d'extraction des CPT ou sur le pourcentage d'inhibition du DPPH $\cdot$ .

Il apparait à partir de la figure 12 (a) que l'éthanol est le solvant qui permet d'extraire mieux les CPT, la quantité obtenue est de 138,34mg EAG/ g MS. Celle-ci est significativement élevée

que celles obtenues avec l'acétone (130,03mg EAG/ g MS), le méthanol (110,71mg EAG/g MS) et l'eau (93,91mg /g MS).

La figure 12 (b) relative à l'effet du solvant sur l'inhibition du DPPH<sup>•</sup>, révèle aussi des différences significatives à  $P \leq 0,05$ , entre les quatre extraits. En effet, la plus forte capacité à piéger le radical DPPH<sup>•</sup> a été observée avec l'extrait éthanolique (53,50%), suivi par celles des extraits aqueux (46,78%), méthanolique (30,14%) et enfin celle acétonique (20,19%).

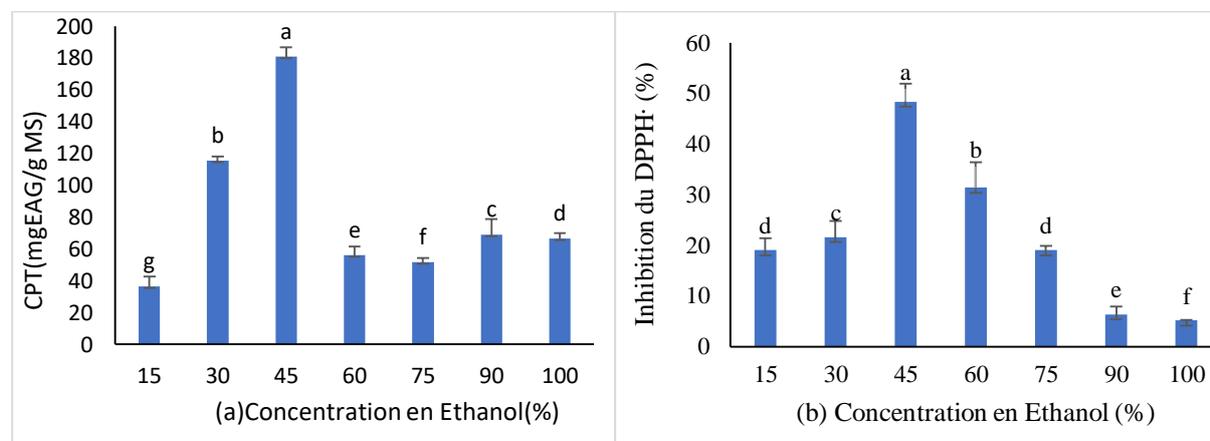
Les variations notées dans les teneurs entre les solvants sont dues à la différence de solubilité des CPT dans ces derniers qui sont de différentes polarités (Naczki and Shahidi, 2006). Des études réalisées sur les feuilles du goyavier de Chine et d'Indonésie ont montré que l'éthanol est le meilleurs solvant d'extraction de CPT comparés à l'autre solvant testé(eau) (Qian et Nihorimbere, 2004 ; Noer et al., 2015).

Du point de vue quantitatif, You et al. (2011) a aussi indiqué des variations selon la nature du solvant utilisé et ont rapportés des concentrations en CPT plus faibles dans les feuilles d'un cultivar de Corée du sud qui sont de l'ordre de 12,95, 14,13 mg, 13,079 mg et 10,36 mg EAG/g MS dans les extraits éthanolique, acétonique, méthanolique et aqueux respectivement.

## 2.2. Optimisation de la concentration du solvant d'extraction

Après avoir déterminé le type du solvant approprié pour l'extraction des composés phénoliques avec une meilleure inhibition du DPPH<sup>•</sup> qui est l'éthanol, différentes concentrations de ce solvant ont été étudiées afin de déterminer leur effet sur l'extraction des composés phénoliques et leur performance à inhiber le DPPH<sup>•</sup> (15%, 30%, 45%, 60%, 75%, 90%, 100%).

Les résultats obtenus (figure 13 (a)et (b)) ont révélé des différences significatives à  $P \leq 0,05$ .



**Figure 13 :** (a) : Teneurs en composés phénoliques totaux, (b) : Inhibition du DPPH<sup>•</sup>, des extraits des feuilles obtenus par différentes concentrations de l'éthanol.

a, b, c, d, e, f, g: représentent les différences significatives à  $P \leq 0,05$ .  $a > b > c > d > e > f > g$

La figure 13 (a) illustre clairement que la concentration en éthanol influe significativement l'extraction des CPT. Leur concentration augmente pour atteindre le maximum à 45% d'éthanol (180,77mg EAG/g MS), puis elle diminue graduellement avec l'augmentation du pourcentage d'éthanol. La plus faible teneur en CPT a été enregistrée à 15% d'éthanol (36,43mg EAG/g MS).

De même pour l'activité antiradical DPPH<sup>•</sup> (Figure 13 b), le % de son inhibition varie selon la concentration de l'éthanol, celui-ci augmente graduellement de 19,03 % à 15% jusqu'à atteindre le maximum 48,34% à 45%, puis il diminue jusqu'à environ 10 fois moins (5,14 %) à 100% de solvant pur.

D'après les résultats obtenus, l'éthanol à 45% apparaît comme le plus efficace pour l'extraction des CPT et pour le piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> à la concentration du 0,05mg/ml.

Nos résultats sont similaires à ceux de **Qian et Nihorimbere (2004)** qui ont obtenu la teneur maximale en CPT, dans l'extrait éthanolique de feuilles du goyavier de Chine, dont le solvant utilisé a été à 50% et à la ration de 1/10 (g/ml).

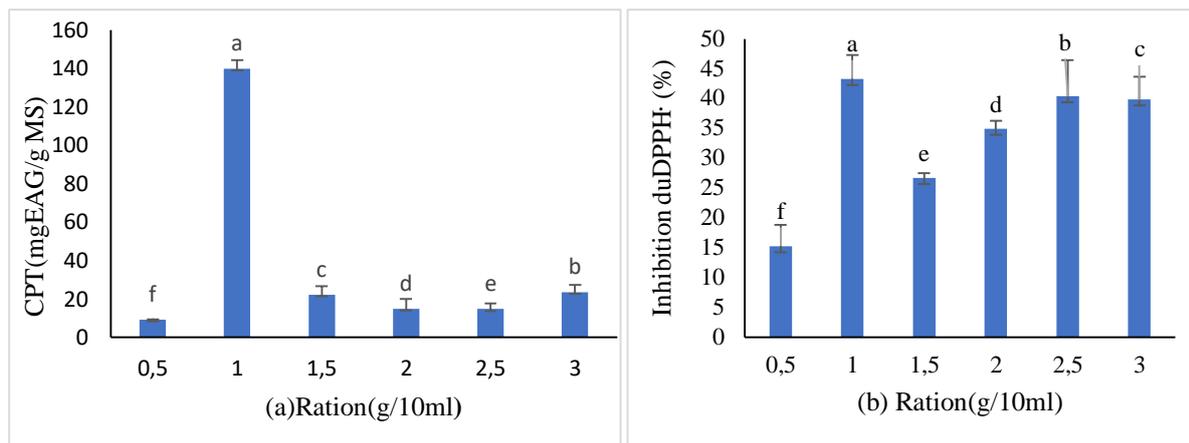
### **2.3. Optimisation du ratio (variation de la quantité de la matrice)**

Les rapports étudiés (quantité variable de matrice/même volume de solvant) varient de de 0,5 à 3 g /10ml avec un écart de 0,5 g. Les résultats obtenus, de l'effet de ces rapports sur l'extraction de CPT ainsi que leur activité antiradical DPPH<sup>•</sup>, révèlent des différences significatives à  $P \leq 0,05$  (Figure 14).

Selon la figure14(a), les concentrations en CPT des extraits ont été classées selon le rapport décroissant suivant : 1/10 (139,82mg EAG/g MS), 3/10 (23,30 mg EAG/ g MS), 1,5/10 (22,32mg EAG/g MS), 2/10 (15,06mg EAG/g MS), 2,5/10 (14,74 mg EAG/g MS), 0,5/10 (9,37mg EAG/g MS).

La concentration obtenue avec le rapport 1/10 représente 6 fois plus de celle du 2<sup>e</sup> rapport et environ 13 fois plus que celle du dernier rapport selon l'ordre de classification.

Concernant l'activité antiradical DPPH<sup>•</sup> (Figure14b), les résultats sont classés selon le rapport décroissant suivant : d'on rapport 1/10 (43,29 %), 2,5/10 (40,33 %), 3/10 (39,80 %), 2/10 (34,87 %), 1,5/10 (26,62 %), 0,5/10 (15,24 %).



**Figure 14** : Influence de la variation de la quantité de la matrice sur la teneur des feuilles du goyavier en composés phénoliques totaux (a), et sur l'inhibition du DPPH (b).

a, b, c, d, e, f : représentent les différences significatives à  $P \leq 0,05$ .  $a > b > c > d > e > f$

D'après les résultats obtenus, le rapport de 1 g de matière/10 révèle un meilleur effet sur l'extraction de CPT ainsi que sur l'activité antiradicalaire.

Nos résultats sont similaires à ceux de **Qian et Nihorimbere (2004)** qui ont obtenu une teneur maximale en CP dans l'extrait de feuilles du goyavier de Chine, en utilisant comme solvant l'éthanol à une ration de 1g de poudre dans 10 ml du solvant.

#### 2.4. Optimisation du ratio (variation du volume de solvant)

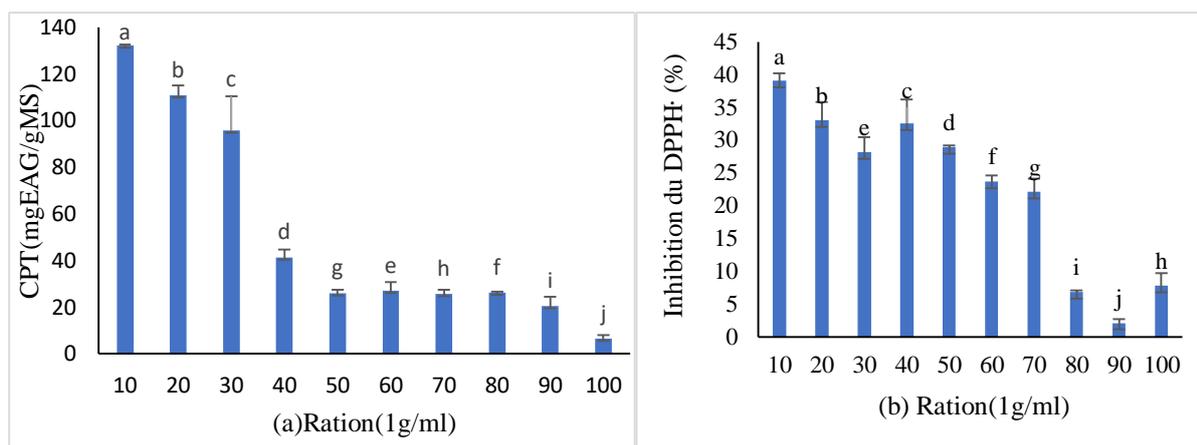
La quantité de matrice étant fixée à 1 g et le volume de solvant à 45% a été varié de 10 à 100 ml. Les résultats de l'effet de ces ratios sur les CPT et sur leur activité antiradical DPPH\* sont présentés dans la figure (15 a et b). Selon ces résultats, la variation du ratio (volume de solvant) a un effet sur le taux d'extraction des CPT ainsi que sur l'inhibition du DPPH. En effet, et globalement, une diminution de ces deux paramètres a été observée avec l'augmentation du volume de solvant ; les différences sont significatives à  $P \leq 0,05$ .

Les concentrations des extraits en CPT Figure(15a) sont classées dans l'ordre décroissant suivant : le rapport 1/10 (132,03mg EAG/g MS), le rapport 1/20 (110,76mg EAG/g MS), le rapport 1/30 (95,70mg EAG/g MS), le rapport 1/40 (41,38mg EAG/g MS), le rapport 1/60 (26,95mg EAG/g MS), le rapport 1/80 (26,22mg EAG/g MS), le rapport 1/50 (26,01mg EAG/g MS), le rapport 1/70 (25,69mg EAG/g MS), le rapport 1/90 (20,43mg EAG/g MS), le rapport 1/100 (6,42mg EAG/g MS).

La concentration notée à 1/10 a permis une meilleure extraction des CPT, elle représente 10 mg de plus de celle du 2<sup>e</sup> ratio et 22 fois plus de celle du dernier ratio selon l'ordre de classification.

Concernant l'activité antiradiclaire Figure(15b), les résultats sont classés dans l'ordre décroissant suivant : le rapport 1/10 (39,04 %), le rapport 1/20 (33,07 %), le rapport 1/40 (32,56 %), le rapport 1/50 (28,95 %), le rapport 1/30 ( 28,19 %), le rapport 1/60 (23,73 %), le rapport 1/70 (22,13 %), le rapport 1/100 (7,82 %), le rapport 1/80 (6,84 %), le rapport 1/90 (2,15 %).

À l'issu de cette analyse, il s'avère que le ratio 1g/10 ml de solvant est celui qui possède la meilleure propriété pour extraire plus de CPT avec une meilleure activité antiradiclaire DPPH·.



**Figure 15 :** Influence de variation de volume de solvant sur la teneur des feuilles du goyavier en composés phénoliques totaux (a), et sur l'inhibition du DPPH· (b).

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j : représentent les différences significatives à  $P \leq 0,05$ .  $a > b > c > d > e > f > g > h > i > j$

**Qian et Nihorimbere (2004)** ont noté dans leur étude, sur les feuilles du goyavier, une teneur maximale en CP dans un extrait éthanolique des feuilles avec un rapport de 1/10.

Le volume de solvant doit être suffisant pour s'assurer que la matrice solide demeure entièrement immergée dans le solvant. Toutefois, un ratio plus élevé peut entraîner la baisse du rendement, ceci est probablement dû à la dilution de l'extrait dans le solvant (**Eskilsson et al., 1999**).

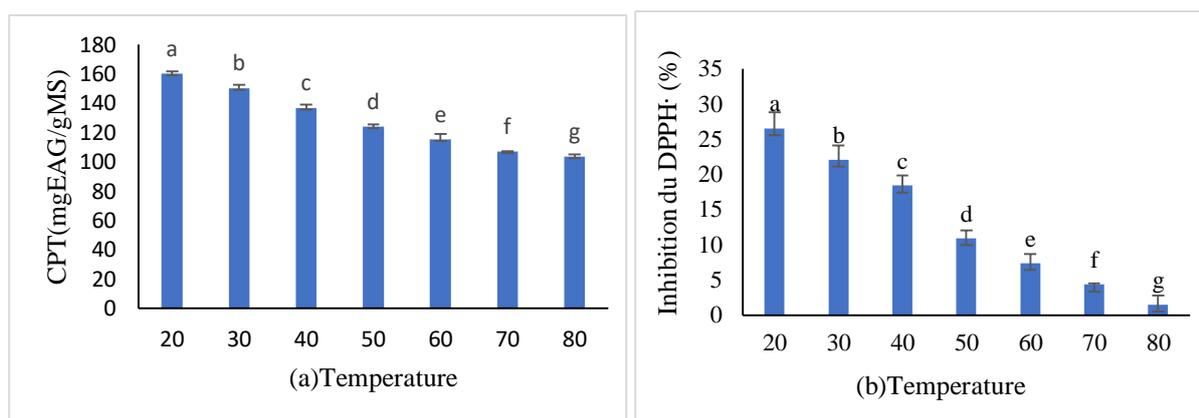
Selon **Pinelo et al. (2005)**, la concentration la plus élevée de CPT et la meilleure capacité antiradiclaire ont été obtenues quand un bas rapport solide/liquide est employé.

## 2.5. Optimisation de la température d'extraction

L'impact de la température sur l'extraction des CPT ainsi que sur leur activité antiradical DPPH· a été évalué dans la gamme de 20 à 80°C, figure 16 (a et b). Il ressort que le chauffage a un effet négatif sur ces paramètres. En effet, la teneur en CPT et leur activité diminuent avec l'élévation de la température. Les différences sont significatives à  $P \leq 0,05$ .

Les résultats relatifs aux concentrations en CPT des extraits (figure 16 a) sont classés dans l'ordre décroissant suivant : 20°C (159,93mg EAG/g MS), 30°C (150,14mg EAG/g MS), 40°C (136,56mg EAG/g MS), 50°C (123,82mg EAG/g MS), 60°C (115,08mg EAG/g MS), 70°C (106,86mg EAG/g MS), 80°C (103,50mg EAG/g MS).

La figure 16b illustre l'évolution de l'activité antiradical DPPH· en fonction de la température. Les résultats sont classés dans l'ordre décroissant suivant : 20°C (26,56 %), 30°C (22,10 %), 40°C (18,45 %), 50°C (10,95 %), 60°C (7,40 %), 70°C (4,36 %), 80°C (1,52 %).



**Figure 16 :** Influence de la température sur la teneur des feuilles de goyavier en composés phénoliques totaux (a), et sur l'inhibition du DPPH· (b)

a, b, c, d, e, f, g : représentent les différences significatives à  $P \leq 0,05$ .  $a > b > c > d > e > f > g$

Cette étude révèle que la température de 20°C exerce un meilleur effet sur le taux d'extraction des CPT enregistré et l'activité antiradical DPPH·

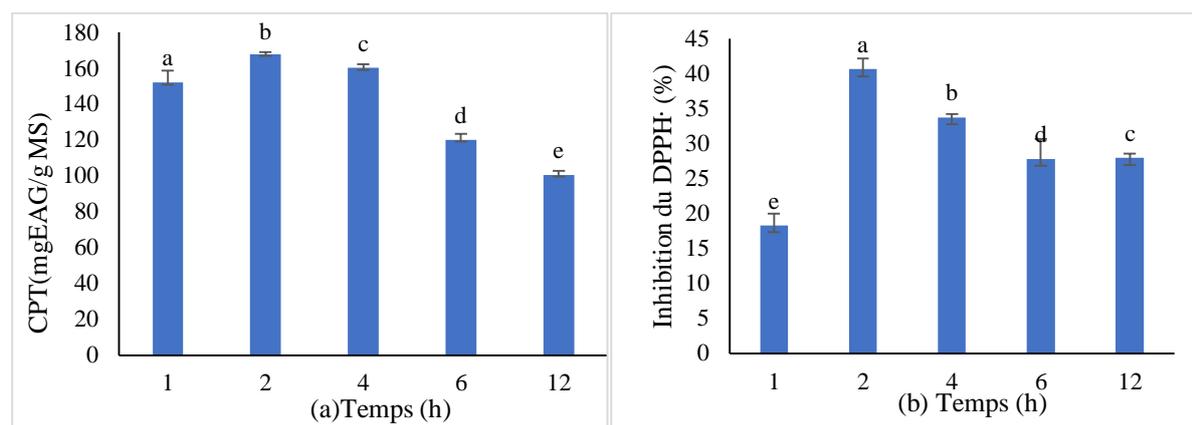
Les résultats de la présente étude sont, également, en accord avec les résultats de **Qian et Nihorimbere (2004)**, qui ont indiqué que l'extraction des CPT à température ambiante donne les rendements le plus élevée et une activité antioxydante maximale. Aussi, la diminution des teneurs en CPT et de l'activité antioxydante observée peut-être expliquée par la présence des substances thermosensibles et qui par conséquent peuvent se dégrader ou se décomposer sous l'effet de la température.

## 2.6. Optimisation du temps d'extraction

L'effet du temps sur le taux d'extraction des CPT et leur activité antiradical DPPH· a été étudié. Différentes durées d'incubation de l'extraction ont été testées allant de 1 à 12h. La figure 17 (a et b) montre les résultats obtenus.

La durée d'incubation a un effet sur la concentration en CPT excrète figure (17a). Leur taux augmente de 152,03mg à 167,93mg EAG/g MS après 1h et 2h d'incubation respectivement. Cette teneur diminue avec la prolongation de la durée d'incubation passant à 160,14mg après 4h à 120,03mg après 6h et enfin à 100,55mg EAG/g MS après 12h.

Pareillement, l'activité antiradicalaire DPPH· dépend de la durée d'incubation figure (17b). Cette activité augmente pour atteindre le maximum après 2h puis elle diminue graduellement en fonction du temps. Les résultats sont classés dans l'ordre décroissant suivant : 2h (40,65 %), 4h (33,77 %), 12h (27,95 %), 6h (27,84 %), 1h (18,32 %).



**Figure 17:** Influence du temps d'extraction sur la teneur des feuilles de goyavier en composé phénoliques totaux (a), et sur l'inhibition du DPPH· (b).

a, b, c, d, e : représentent les différences significatives à  $P \leq 0,05$ .  $a > b > c > d > e$

Les résultats de cette présente étude ont montré que la durée d'extraction a un effet significatif sur le rendement en CPT et l'activité antiradicalaire sur le DPPH· des extraits de feuille. Il en ressort que le temps d'extraction optimum est de 2h.

Le temps pendant lequel le solvant et le matériel végétal sont mis en contact peut influencer la libération progressive de solutés à partir de la matrice végétale vers le solvant, et par conséquent l'efficacité de l'extraction (Michiels et al., 2012).

Par contre, un temps de contact prolongé n'améliore pas toujours l'efficacité de l'extraction en favorisant l'oxydation des composés phénoliques (Santos-Buelga et al., 2012). Ce qui est confirmé également par les travaux de Benchikh et Louailèche (2014).

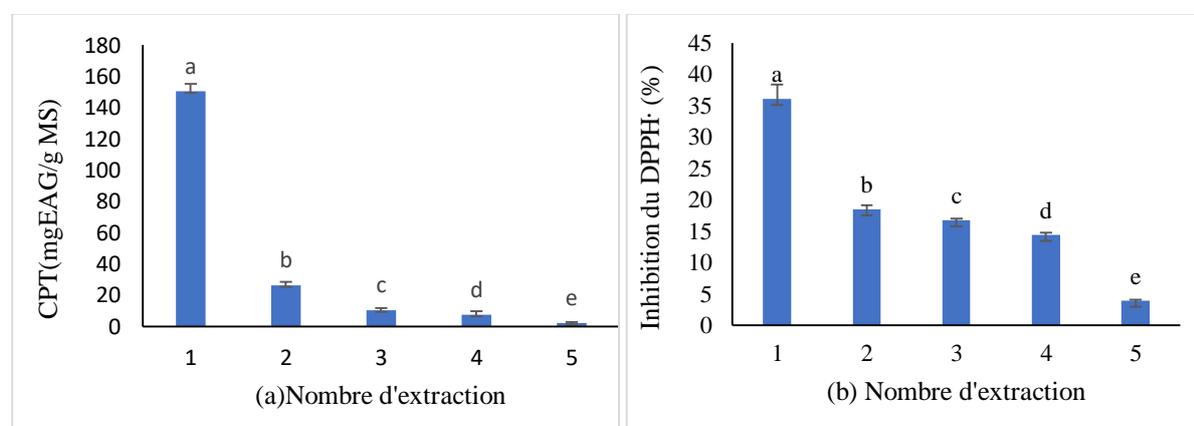
Contrairement, les travaux de Noer et al. (2015) ont abouti à une meilleure extraction après une durée de 6h. Selon ces mêmes auteurs, le temps requis pour extraire les composés actifs dépend de la quantité de composés actifs à extraire et le solvant utilisé. Plus la teneur en composés actifs est importante, plus le temps d'extraction requis sera long.

## 2.7. Optimisation du nombre d'extraction

L'impact du nombre d'extraction sur le taux d'extraction CPT ainsi que sur leur activité antioxydante a été étudié. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 18 a,b qui montre clairement qu'entre les cinq extraits résultent de quatre répétitions d'extraction, des variations de teneur en CPT et de leur activité qui sont significativement différentes à  $P \leq 0,05$ .

Le nombre de répétition d'extraction des CPT a un effet sur leur concentration. La figure 18a révèle que la 1<sup>re</sup> extraction permet d'obtenir la quantité la plus importante en CPT (150,35mg EAG/g MS). A partir de la 1<sup>re</sup> répétition, la concentration en CPT diminue à 26,22mg dans le 2<sup>e</sup> extrait puis à 10,21mg dans le 3<sup>e</sup> extrait, à 7,37 mg dans le 4<sup>e</sup> extrait et enfin à 1,90 mg EAG/g MS dans le 5<sup>e</sup> extrait.

Le même phénomène a été observé avec l'activité antiradiclaire sur le DPPH $\cdot$ . En effet, le meilleur % d'inhibition du DPPH $\cdot$  est obtenu avec le 1<sup>er</sup> extrait (36,10 %) puis celui-ci diminue avec le nombre de répétition de l'extraction dans cette ordre : 2<sup>e</sup> extraction (18,50 %), 3<sup>e</sup> extraction (16,81 %), 4<sup>e</sup> extraction (14,44 %) et enfin la 5<sup>e</sup> extraction (3,95 %).



**Figure18:** Influence de nombre d'extraction sur la teneur des feuilles de goyavier en CPT (a), et sur l'inhibition du DPPH $\cdot$  (b).

a, b, c, d, e : représentent les différences significatives à  $P \leq 0,05$ .  $a > b > c > d > e$

Il ressort des résultats que la première extraction permet d'aboutir à un meilleur taux de CPT qui correspond, également, à une meilleure activité antiradiclaire. Cependant, elle ne permet pas l'épuisement de l'échantillon étant donné que les extraits qui suivent le 1<sup>er</sup>, présentent des taux de CPT qui diminuent avec le nombre d'extraction, mais possédaient des activités antiradicalaires. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que certains CPT nécessitent plus de temps et plus solvant pour les détacher de la matrice.

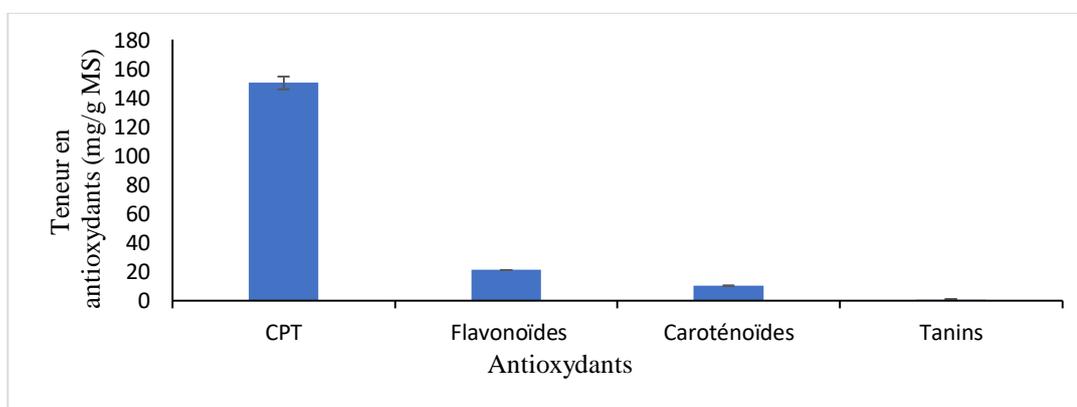
L'étude de **Camarena-Tello et al. (2018)**, ont montré que la 1<sup>re</sup> extraction ne permet obligatoirement l'obtention d'un meilleur taux de CPT. En effet, celui-ci est obtenu après un double extraction, à partir des feuilles du goyavier en utilisant du chloroforme, de l'acétone et de l'eau. Ceci revient, probablement, à la nature des solvants utilisés et aussi de la matrice.

### 3. Teneur en antioxydants

Les dosages de l'ensemble des antioxydants (composés phénoliques totaux, flavonoïdes, tanins et caroténoïdes) des extraits de poudre de feuilles du goyavier sont effectués par spectrophotométrie selon plusieurs protocoles sur l'extrait obtenu après optimisation de l'ensemble des paramètres étudiés à savoir la nature du solvant d'extraction, la concentration du solvant d'extraction, le ration (variation de la quantité de la matrice et du volume de solvant), la température d'extraction, le temps d'extraction et en fin, le nombre d'extraction.

Concernant, le dosage des caroténoïdes, celui -ci a été effectué, directement, à partir de la poudre de feuilles du goyavier.

Les résultats de la teneur en antioxydants de la poudre de feuilles du goyavier sont reportés sur la figure 19.



**Figure 19** : Teneur en antioxydants de la poudre de feuilles du goyavier

### **3.1. Teneur en CPT**

Les composés phénoliques jouent un rôle primordial dans l'activité antioxydante, par conséquent, ils peuvent avoir des effets positifs sur la santé, notamment des effets anti-inflammatoires, antihyperglycémiques, hépatoprotecteurs, antalgiques, anticancéreux et protecteurs contre les maladies cardiovasculaires **Camarena-Tello et al. (2018)**.

L'examen des résultats (figure 19) montre que l'extrait de l'échantillon étudié présente une teneur élevée en CPT de l'ordre de 150,35 g EAG/g MS.

**You et al. (2011)** ont rapporté une valeur plus faible de 12,95 mg EAG/g MS dans l'extrait éthanolique des feuilles de goyavier de Corée du sud, alors que **Diaz et al. (2016)** ont pu extraire une teneur supérieure de 304mg/g MS dans l'extrait éthanolique de feuilles de goyavier du Mexique.

### **3.2. Teneur en flavonoïdes**

Les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont dues à plusieurs différents mécanismes, tels que le piégeage des radicaux libres, chélation des ions métalliques, comme le fer et le cuivre, et l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres. Selon leur structure, les flavonoïdes sont capables pratiquement de piéger tous les radicaux libre existants (**Marar et al., 2012**).

Dans la présente étude, l'extrait de poudre de feuilles du goyavier présente une teneur en flavonoïdes de 21,20 mg EQ/g MS (figure 19). Cette valeur est supérieure à celle trouvé par **Gutiérrez et al. (2008)**, réalisé sur les feuilles du goyavier récoltées au Mexique (2,88 mg/g MS).

### **3.3. Teneur en tanins**

La teneur en tanins de l'extrait de la matrice étudiée présente une teneur de 0,87m g EC/gMS (figure 19). Cette valeur est inférieure à celle trouvée par **Mailoa et al. (2013)** et **Marar et al. (2012)** qui ont enregistré 3,23 et 3,81 mg/g MS dans les extraits éthanoliques de feuille de goyavier d'Indonésie et d'Inde respectivement.

### **3.4. Teneur en caroténoïdes**

Les caroténoïdes ont la capacité de détoxifier diverses formes d'oxygène activé. Ils peuvent intervenir en réagissant avec les produits de peroxydation lipidique pour mettre fin aux réactions en chaîne ou en récupérant l'oxygène singlet ou en réagissant avec le triplet ou exciter les molécules de chlorophylles pour empêcher la formation de singlet l'oxygène ou par la

dissipation de l'énergie d'excitation excédentaire à travers le cycle de xanthophyll (**Marar et al., 2012**).

La teneur en caroténoïdes de l'extrait de feuille du goyavier présente une teneur de 10,37 mg E $\beta$ -car /g MS (figure 19). Cette valeur est plus élevée que celle obtenue par **Krishnaveni et al. (2013)** sur les feuilles de goyavier d'Inde (8 mg/g MS).

Ces différences observées en antioxydants obtenues dans cette étude comparés à la littérature peuvent revenir au type de la variété utilisée et son origine ainsi que le type du solvant.

#### 4. Activités antioxydantes

La concentration d'antioxydants nécessaire pour réduire de moitié (50%) la concentration initiale du substrat (EC<sub>50</sub>) est un paramètre largement utilisé pour mesurer la puissance de l'activité antioxydante, plus l'EC<sub>50</sub> est bas, plus la puissance antioxydante est élevée (**Qian et Nihorimbere, 2004**).

Afin d'évaluer l'efficacité des différents extraits étudiés, l'EC<sub>50</sub> a été déterminé. Les résultats des trois activités antioxydantes testés (activité antiradicalaire, réduction du phosphomolybdate, réduction du chlorure ferrique) sont présentés dans le tableau VI.

**Tableau VI :** Activités antioxydantes des extraits de poudre de feuilles du goyavier

Les activités antioxydantes	EC <sub>50</sub> (mg/ml)
Activité antiradicalaire (Inhibition du DPPH $\cdot$ )	2,35
Réduction du phosphomolybdate	3,48
Réduction du chlorure ferrique	3,84

##### 4.1. Activités antiradicalaire (Inhibition du DPPH $\cdot$ )

Les résultats montrent que le taux d'inhibition en DPPH $\cdot$  augmente d'une façon linéaire avec les concentrations des différents extraits utilisés.

Dans notre cas, l'activité antiradicalaire des feuilles présente une EC<sub>50</sub> de 2,35 mg/ml. L'activité de l'échantillon étudié est meilleure à celle obtenue par (**Qian et Nihorimbere, 2004**) dans leur étude sur des feuilles du goyavier de Chine (EC<sub>50</sub> :53 mg/g).

Par ailleurs, elle se montre moyenne à celle obtenue dans le travail d'**Ademiluyi et al. (2016)**, réalisé sur trois variétés de goyavier récoltées au Niger. Ces auteurs, ont noté des IC<sub>50</sub> de 9,91mg/ml ; 0,89mg/ml et 0,73mg/ml pour les extraits de feuilles de *Short white fleshguava*, *Strippedguava* et *Pinkguava* respectivement.

## **4.2. Pouvoir réducteur**

### **4.2.1. Réduction du phosphomolybdate (PMB)**

Cette analyse est basée sur la réduction de  $\text{Mo}^{6+}$  en  $\text{Mo}^{5+}$  en présence d'extrait, suivi par la formation d'un complexe phosphate/ $\text{Mo}^{5+}$  en donnant une coloration verte détectable à une longueur d'onde de 695 nm (**Bougatef et al., 2009**).

Les résultats montrent que le pouvoir réducteur de l'extrait est dose-dépendante, c'est-à-dire que la capacité de réduction du phosphomolybdate est proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'échantillon.

Dans la présente étude, le pouvoir réducteur de l'extrait de poudre de feuilles de goyavier présente un  $\text{EC}_{50}$  de 3,48 mg/ml.

### **4.2.1. Réduction du chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ )**

La présence de réducteurs (antioxydants) provoque la réduction du complexe  $\text{Fe}^{3+}$  / chlorure ferrique à la forme ferreuse ( $\text{Fe}^{2+}$ ). L'absorbance à 700 nm permet de surveiller la concentration en  $\text{Fe}^{2+}$ . Une absorbance plus élevée indique un pouvoir réducteur plus élevé.

Dans notre étude, le pouvoir réducteur des feuilles présente un  $\text{EC}_{50}$  de 3,84 mg/ml qui inférieure à celle enregistré par **Marar et al. (2012)** qui ont pu constater un super pouvoir réducteur du chlorure ferrique de 68,66mg/g dans l'extrait éthanolique de feuilles du goyavier d'Inde.

# *Conclusion*

Pour une extraction efficace et optimale des composés phénoliques, avec une activité antioxydante élevée, à partir des feuilles du goyavier, la technique d'extraction par macération a été utilisée. Sept facteurs ont été optimisés à savoir :

1. le type de solvant : quatre solvants ont été testés (acétone, méthanol, éthanol et eau),
2. la concentration du solvant : sept concentrations du solvant optimisées en 1<sup>re</sup> étapes (15, 30, 45, 60, 75, 95 et 100%),
- 3.- le rapport solide/liquide : les solide (matrice) et liquide (solvant) ont été variés en 2 phases :
  - variation de la quantité de la matrice : le volume fixé à 10ml et la matrice a été varié de 0,5 à 3 g (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 et 3 g),
  - variation du volume : la quantité de la matrice étant fixée à 1g et le solvant a été varié de 10 à 100 ml (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 ml),
4. la température d'extraction : sept températures ont été étudiées allant de 20 à 80°C (20, 30, 40, 50, 60, 70 et 80 °C),
5. le temps d'extraction ; la durée de l'extraction a été variée de 1 à 12h (1, 2, 4, 6 et 12h),
6. et enfin le nombre d'extraction : l'extraction a été répétée 4 fois, ce qui nous a permis d'avoir à l'issue de l'expérience cinq extraits.

Les résultats obtenus, par facteur, indiquent des différences significatives à la probabilité  $P < 0,05$  en terme de teneur en CPT en activité antiradicalaire sur le DPPH. Les conditions expérimentales optimales qui maximisent l'extraction des composés phénoliques des feuilles du goyavier sont :

Le meilleur solvant pour l'extraction des CPT est l'éthanol à 45 %, l'addition de l'eau fait améliorer leur teneur et leur activité. Par ailleurs, le rapport solide /liquide les affecte, également, de façon significative, plus le volume du solvant augmente, plus la concentration en CPT et leur activité augmentent, le meilleur rapport trouvé est 1/10 (g/ml). La température le temps influent de manière inverse, à plus faibles valeurs, l'extraction des TPT est meilleure de même pour leur activité antiradicalaire qui sont à leur optimum à une température de 20°C pendant une durée d'extraction de 2h.

Enfin, le nombre d'extraction montre que la première extraction permet d'aboutir à un meilleur taux de CPT qui correspond, également, à une meilleure activité antiradicalaire. Cependant, elle ne permet pas l'épuisement en CPT d'où la nécessité d'augmenter le nombre de répétition et de combiner l'ensemble des extraits obtenus.

Les dosages des antioxydants : CPT, flavonoïdes, tanins et caroténoïdes, ont montré que l'extrait des feuilles du goyavier obtenu après optimisation des sept facteurs suscités, est très riche en CPT (150,35mg EAG/g MS) et en flavonoïdes (21,20mg EQ/g MS) et des valeurs moyennes en tanins (0,87mg EC/g MS) et en caroténoïdes (10,37mg E $\beta$ -car /g MS).

L'activité antioxydante de l'extrait de la matrice étudiée a été évaluée par trois tests qui ont révélé des valeurs proches. En effet, les EC50 obtenues sont de l'ordre de 2,35 mg/ml (DPPH $\cdot$ ), de 3,84 mg/ml (réduction du F $^{3+}$ ) et de 3,48 mg/mL (réduction du phosphomolybdate).

Enfin, en termes de perspectives et dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant :

- D'étudier d'autres facteurs et conditions qui pourraient influencer l'optimisation de l'extraction des composés bioactifs tels que le stade de développement des feuilles, le pH, la fréquence des ultrasons mais aussi la variété et le climat qui pourraient éventuellement améliorer le rendement de l'extraction ;
- D'utiliser des techniques d'analyse avancées (HPLC, RMN... etc) pour mieux quantifier et identifier les antioxydants ;
- De réaliser des tests (*in vivo*) des extraits optimaux afin de déterminer leurs effets sur la santé ;
- D'étudier les activités antibactériennes, notamment sur des espèces pathogènes.

# *Références bibliographiques*

## A

**Ademiluyi A. O. G., Oboh O. B. O., et Oloruntoba F. M. (2016).** A comparative study on antihypertensive and antioxidant properties of phenolic extracts from fruit and leaf of some guava (*Psidium guajava L.*) varieties. *Comparative Clinical Pathology* 2, 363-374.

**Adrian J. A. L.N. Q., Arancon B. W. M., et Carpenter J. R. (2012).** Proximate analysis, in vitro organic matter digestibility, and energy content of common Guava (*Psidium guajava L.*) and yellow, strawberry Guava (*Psidium cattleianum Var. lucidum*) tree parts and fruits as potential forage. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 10398-10405.

**Al-Farsi M., Alasalvar C., Morris A., Baron M., et Shahidi F. (2005).** Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera L.*) varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53,7592-7599.

**Al-Farsi M.A. et Lee C.Y.(2008).**"Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry* 108, 977-985.

**Afroze F. T. Hossain, 2015.** Proximate analysis, phytochemical screening and antioxidant activity of psidium guajava leaves growing in coastal area of bangladesh ., *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, p. 12.

**Alimi H., Hfaiedh N., Bouoni Z., Sakly M., Rhouma K. B. (2011).** Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indicaf.* inermis flowers extract in rats. *Environmental toxicology and pharmacology* 32,406-416.

**Argueta, V., Cano L., et Rodarte M. (1994).** Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana: Instituto Nacional Indigenista. *México* :559.

## B

**Baby Joseph, 2011.** Review on nutritional, medicinal and pharmacological roperties of guava (psidium guajava linn.). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*.

**Barone E., Calabrese V., Cesare M. (2009).** Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. *Biogerontology*, 10,97–108

**Bartolome A., Mandap K., David K.J., Sevilla F., Villanueva J. (2006).** SOS-red fluorescent protein (RFP) bioassay system for monitoring of antigenotoxic activity in plant extracts. *Biosensors and Bioelectronics* 21,2114–2120.

- Bartolomé-Camacho et José Octavio Rodiles-López. (2018).** Quantification of Phenolic Compounds and In Vitro Radical Scavenging Abilities with Leaf Extracts from Two Varieties of *Psidium guajava* L. *Antioxidants*
- Bennick, A. (2004).** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13:184-186.
- Berger M.M. (2006)** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20,48-53.
- Bougatef A., Hajji M., Balti R., Lassoued I., Triki-Ellouz Y., Nasri M. (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114,1198-1205.
- Bourgeois Paul, Guylene. S. Aurore, Abaul Jacqueline et Joseph Henri. (1998).** Valorisation de la graine de goyave : huile de l'amande et de poudre abrasive des coques
- Buvi-Koji A., Planinić M., Tomas S., Jokić S., Mujić I., Bilić M., et Velić D.( 2011).** Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61,195-199.
- Brand-Williams, W., M.-E. Cuvelier, . Berset. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology* 28 ,25-30.
- Bozin B., Mimica-Duric N., Samojlik I., Goran A., et Igc R. (2008).** Phenolics as anti oxydants in garlic (*Allium sativum* L. Alliaceae). *Food Chemistry*, 111,925-929.

## C

- Camarena-Tello, Julio César, Héctor Eduardo Martínez-Flores, Ma. Guadalupe Garnica-Romo, José Saúl Padilla-Ramírez, Alfredo Saavedra-Molina, Osvaldo Alvarez-Cortes, María Carmen Chang, W.S., (2018).** Studies on active principles of hypoglycemic effect from *Psidium guajava* (I). Thesis. The Graduate Institute of Pharmacy, Taipei Medical College.
- Camarena-Tello, J. C., Héctor Eduardo Martínez-Flores, Ma. Guadalupe Garnica-Romo, José Saúl Padilla-Ramírez, Alfredo Saavedra-Molina, Osvaldo Alvarez-Cortes, María Carmen Bartolomé-Camacho and José Octavio Rodiles-López. (2018).** Quantification of Phenolic Compounds and In Vitro Radical Scavenging Abilities with Leaf Extracts from Two Varieties of *Psidium guajava* L. *Antioxidants*, 7, 34 .
- Chen H.H., Wu P.H. , Lo D., Pan Y.C. , Wu M.C. (2011).** Hepatoprotective effect of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts on ethanol-induced injury on clone 9 rat liver cells. *Food and Nutrition Sciences* 2 ,983.

**Chou S.T., Chao W.W. and Chung Y.C. (2003).** Antioxidative activity and safety of 50% ethanolic red bean extract (*Phaseolus radiatus* L. var. Aurea). *Journal of Food Science*, 68, 21-25.

**Conde Garcia E., Nascimento V., Santiago Santos A. (2003).** Inotropic effects of extracts of *Psidium guajava* L.(*guava*) leaves on the guinea pig atrium. *Brazilian Journal of Medical*

**Conforti F., Loizzo M. R. L, Statti G. A., Menichini F. (2005).** Comparative radical scavenging and antidiabetic activities of methanolic extract and fractions from *Achillea ligustica* ALL. *Biological and pharmaceutical bulletin* 28 (9):1791-1794.and *Biological Research* 36 ,661-668.

## D

**Dakappa S. S., Adhikari R., Timilsina S. S., et Sajjekhan S. (2013).** A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn.(Myrtaceae). *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 3 .

**Degrout A.E. (2013).** Etude de l'impact des procédés de transformation sur la diffusion des caroténoïdes : cas du lycopène de la tomate. Thèse de doctorat de Sciences agricoles. Université d'Avignon, 195p.

**Dent, M., Dragovic-Uzelac, V., Penic, M., Brncic, M., Bosiljkov, T., and Levaj, B.( 2013).** The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food technology and biotechnology*, 5,:84.

**Derbel S. et Ghedira K (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, Numéro 1:,28-34.

**Djridane A., Yausfi M., Nadjma B., Boutassona D., Stocher P. (2006).** And vital Antioxidant activity of some Algerian medical plants extracts. *Food chemistry*, 97,654-660.

**Dignan C.,Burlingame B.,Kumar S.,Aalbersberg W.(2004).**The pacific Islands food composition tables

## E

**El-Ahmady S. H., M. L.,Ashour M. Wink. (2013).** Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils of *Psidium guajava* fruits and leaves. *Journal of Essential Oil Research* 25 ,475-481.

**Elixabet Diaz-de-Cerio Federica Pasini Vito Verardo Alberto Fern´andez-Guti´errez Antonio Segura-Carretero Maria Fiorenza Caboni . (2016).** *Psidium guajava* L. leaves as source of proanthocyanidins: optimization of the extraction method by RSM and study of the degree of polymerization by NP-HPLC-FLD-ESI-MS *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*

**Ellong, E. N., Billard C., Adenet S., Rochefort K. (2015).** Polyphenols, Carotenoids, Vitamin C Content in Tropical Fruits and Vegetables and Impact of Processing Methods. *Food and Nutrition Sciences*, 06:299–313

**Eskilsson C.S.,Björklund E.,Mathiasson L.,Karlsson L., et Torstensson A.(1999).**Microwave-assisted extraction of felodipine tablets. *Journal of Chromatography A*, 840,59-70.

## F

**Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M., et Barros L. (2007).** Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100: 1511–1516.

**FLORES G., WU S., NEGRIN A., et KENNELLY, E. (2015).** Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. *Food Chemistry*, 170,327-335.

## G

**Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot J.M. (2005).** Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53 ,1370-1373.

**Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4,162-169.

**GUILLOUTY Amandine (2016).** Plantes médicinales et antioxydants. Thèse doctorat en pharmacie .Université Toulouse III Sabatier ,faculté des science pharmaceutiques p53

**Gülçin. İ. (2012).** Antioxidant activity of food constituents: an overview .*Arch Toxicol*, 86,. 345-391.

**Gutiérrez M. P. R., Mitchell S et Rosario V. S. (2008).** *Psidium guajava* : A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. 1-27

## H

**He Q., Venant N. (2004).** Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Zhejiang University-Science A* 5 ,676-683.

## J

**JAIN N., DHAWAN K., MALHOTRA S., SIDDIQUI S., SINGH R. (2003).** Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.). *Compositional and Enzymatic Changes* 58:309– 315.

**Jiménez-Escrig A., M Rincón., R Pulido., et F Saura-Calixto. (2001).** Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of agricultural and food chemistry* 49 ,5489-5493.

**JOSEPH B. (2011).**Review on nutritional,medicinal and pharmacological properties of guajava international.*Journal of pharma and bio science* .

**Joshi H., Kochhar A., Boora R. S. (2017).** Organoleptic and Nutritional Evaluation of Value Added Products Developed from New Varieties of White and *Pink Fleshed Guavas* .

## K

**Kouamé J., Gnoula C., Palé E., Bassolé H., Guissou I.P., Simporé J. et Nikiéma J.B. (2009).** Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). *Science et technique, Sciences de la santé*, 32 ,9 - 23.

**Krishnaveni M., Amsavalli L., Chandrasekar R., Durairaj S., Madhiyan P (2013)** Biochemical Changes in Medicinal Plant Leaves as a Biomarker of Pollution. *Research J. Pharm. and Tech.* 6

**KUMAR S., et PANDEY A. K. (2013).** Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 162750.

## L

**Lagnika L. (2005).** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur. Strasbourg, 249 p.

**Le Bourdelles,J. et P. ESTANOVE (I. F. A. G.). (1967).** LA GOYAVE AUX ANTILLES. 22 ,397 - 412.

**Lin C.Y., Yin M.C. (2012).** Renal Protective Effects of Extracts from Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) in Diabetic Mice. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67,303-308.

## M

**Macheix J. J., Fleuriet A. et jay-allemand C.H. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Presses polytechniques : 6

**Mailoa M. N., Mahendradatta M., Laga A., Djide N. (2013).** Tannin Extract Of Guava Leaves (*Psidium Guajava* L) .*Variation With Concentration Organic Solvents*, 2, 5.

**Manikandan R., Vijaya Anand A. (2015).** A Review on Antioxidant activity of *Psidium guajava*. *Research J. Pharm. and Tech.* 8.

**Marar T., Singh K., Venkatachalam R.N. (2012).** Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of *Psidium guajava*. Department of Biotechnology and Bioinformatics, Padmashree Dr. D. Y. Patil University, Sector 15, CBD Belapur, Navi Mumbai, Maharashtra, India.

**Maurya R., Singh R., Deepak M., Handa S., Yadav P. P., Mishra P. K. (2004).** Constituents of *pterocarpus marsupium*: an ayurvedic crude drug. *Phytochemistry* 65 :915-920.

**Michiels J.A.C., Pincemail J.,Defraigne J.O.,Dommes J.(2012)** Extraction condition can greatly influence antioxydant capacity assays in plant food matrices.*Food chemistry* 130,986-993.

## N

**Naczki M., Shahidi F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 41, 1523-1542.

**Nantitanon W., Yotsawimonwat S., Okonogi S. (2010).** Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of *guava* leaf extract. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1095–1103.

**Noer L., Retno W. K., Iim S., Maria R. D. K. R. (2015).** The Potency of Guava *Psidium guajava* (L.) Leaves as a Functional Immunostimulatory Ingredient. *Procedia Chemistry* 14 p301 – 307.

**Nwozo S., Awe S., Oyinloye B. (2014).** In vitro antioxidant activity of extracts from leaves of ten commonly used medicinal plants 8211; a comparative study. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 3, 211.

## P

**Pinelo M., Rubilar M., Jerez M., Sineiro J. et Núñez M.J. (2005).** Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 ,2111-2117.

**Popovici C., Saykova I. et Bartosz T. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4, 1313 - 8871

**Prieto P., Pineda M., et Aguilar M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry* 269 ,337-341.

## Q

**Qian H., Nihorimbere V. (2004).** Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Science* 5, 676–683.

## R

**ROHWER J. et DUBOURG-SAVAGE M. (2002).** Guide des plantes tropicales. 1st ed. Paris: Delachaux et Niestlé.

**Romocea J.E., BLIDAR C.F., et POPP L. (2008).** The initiation of a tropic shrub species *Psidium guajava*. *Analele Universitatii din Oradea* 58; Fascicula Biologie (unknown):98-107.

## S

**San B., et Yildirim A. N. (2010).** Phenolic, alpha-tocopherol, beta-carotene and fatty acid composition of four promising jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) selections. *Journal of food composition and analysis*, 23, 706-710.

**Santos-Buelga C., Gonzalez-Manzano S., Dueñas M., Gonzalez-Paramas A.M. (2012).** Extraction and isolation of phenolic compounds. *Natural products isolation*, 427-464.

**Sass-Kiss A., Kiss J., Milotay P., Kerek M., Toth-Markus M. (2005).** Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International* 8 :1023-1029.

**Singh, J. (2008).** Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, 67, 32-35.

**Sommya Al-Riyami (2018).** Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Psidium guajava* leaf. *Journal of King Saud University – Science*

**Sugiura M. (2013).** Bioactive Food as Dietary intervention for liver and gastrointestinal disease

## V

**Vasquez J., Delgado C., Couturier G., Matile F. D. (2002).** Les insectes nuisibles au goyavier (*Psidium guajava*, Myrtaceae) en Amazonie péruvienne. 57, p. 323–334.

**Venkatachalam R. N., Kanchanlata S., Thankamani M. (2012).** Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of *Psidium guajava*. Department of Biotechnology & Bioinformatics, Padmashree Dr. D. Y. Patil University, Sector 15, CBD Belapur, Navi Mumbai, Maharashtra, India.

**Vermerris W. et Nicholson R. (2006)** . Phenolic compound biochemistry Pouvoir reducteur. Wilfred, V. and R. Nicholson, 2006: Phenolic compound biochemistry. Springer.

## W

**Weli A., Amna A., Jamal A., Sadri S., Mohammad Amzad H.(2018).** Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Psidium guajava* leaf *Journal of King Saud University-Science*

## Y

**You, D.H. J.W. P., Yuk H.G., et Lee S.C., (2011)** .Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of different parts of guava (*Psidium guajava L.*) .*Food Science and Biotechnology*, 4, 1095-1100.

**SITE WEB :**

<https://www.discoverlife.org> consulté le 26 mars 2019

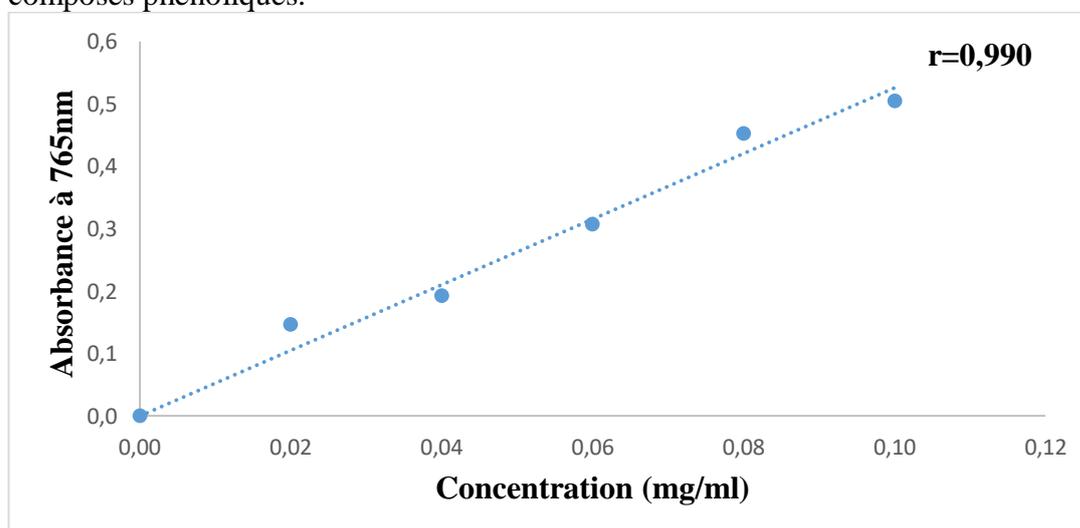
<https://www.djazairess.com> consulté le 14 mars 2019

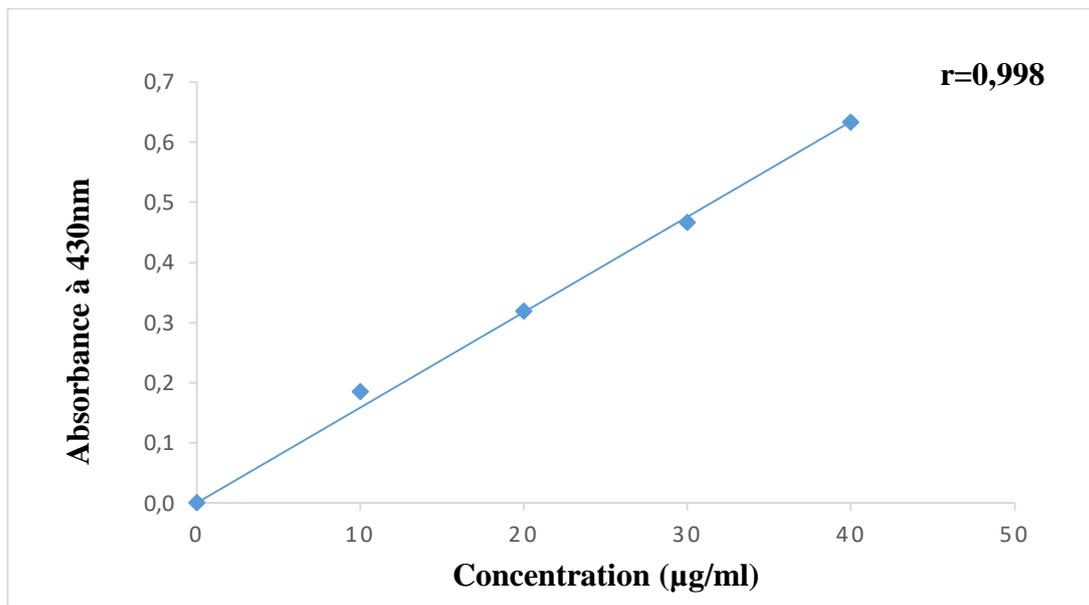
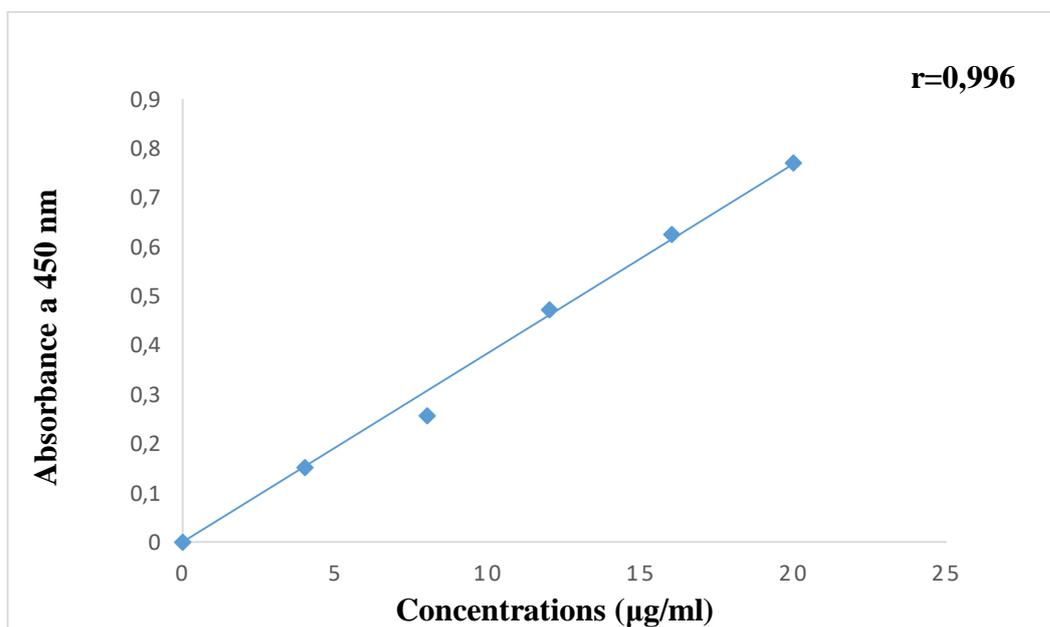
# *Annexes*

**Annexe I :** Les paramètres optimaux pour l'extraction des composés phénoliques des feuilles du goyavier

Paramètres d'extraction	Paramètres optimaux d'extraction
Solvant	Ethanol
Concentration du solvant	45%
Ratio	1/10
Temps d'extraction	2h
Température d'extraction	20°C
Nombre d'extraction	Première extraction

**Annexe II :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la quantification des composés phénoliques.



**Annexe III** : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour la quantification des flavonoïdes**Annexe IV** : Courbe d'étalonnage de la  $\beta$  carotène pour la quantification des caroténoïdes

## Résumé

Dans cette étude, les conditions optimales pour l'extraction des composés phénoliques des feuilles de *Psidium guajava* L., ont été déterminées en étudiant les effets de sept paramètres, à savoir : la nature du solvant d'extraction, la concentration du solvant d'extraction, la ration (variation de la quantité de la matrice), la ration (variation de volume de solvant), la température d'extraction, le temps d'extraction et en fin, le nombre d'extraction. Les conditions optimales pour l'extraction des composés phénoliques sont : le solvant éthanolique à une concentration de 45 %, le rapport solide/liquide de (1/10) (g/ml), une température à (20°C), un temps d'extraction de 2h et la première extraction. Dans ces conditions optimisées, la teneur maximale expérimentale des composés phénoliques totaux est de l'ordre de 150,35 mg EAG/g, les flavonoïdes de 21,20mg EQ/g MS, les tanins de 0,87mg EC/g MS et les caroténoïdes de 10,37mg Eβ-car /g MS. L'activité antioxydante de l'extrait de la matrice étudiée a été évaluée par trois tests qui ont révélé des valeurs proches. En effet, les EC50 obtenues sont de l'ordre de 2,35 mg/ml (DPPH), de 3,84 mg/ml (réduction du F<sup>3+</sup>) et de 3,48 mg/mL (réduction du phosphomolybdate). Ces résultats montrent que l'extrait des feuilles du goyavier constitue une bonne source d'antioxydants ayant des activités antioxydantes intéressantes qui sont influencés par les facteurs sucités.

**Mots clés :** *Psidium guajava* L., composés phénoliques, activités antioxydantes, paramètres d'extraction, propriétés physico-chimiques.

## Abstract

In this study, the optimal conditions for extracting phenolic compounds from *Psidium guajava* L. leaves were determined by studying the effects of seven parameters: the nature of the extraction solvent, the concentration of the solvent, ration (variation in matrix quantity), ration (change in solvent volume), extraction temperature, extraction time and the number of extractions. The optimal conditions for the extraction of phenolic compounds are: ethanol solvent at a concentration of 45%, solid/liquid ratio of (1/10) (g/ml), temperature at 20°C, extraction time of 2 hours and first extraction. Under these optimized conditions, the maximum experimental content of total phenolic compounds is in the range of 150.35 mg EAG/g MS, flavonoids of 21.20mg EQ/g MS, tannins of 0.87mg EC/g MS and carotenoids of 10.37mg E-car/g MS. The anti-oxidant activity was evaluated by the DPPH inhibition test, the IC50 found was (2.35 mg/mL). However, the reductive power determined by the phosphomolybdate and ferric chloride method reveals EC50s in the range of 3.84 mg/mL and (3.48 mg/mL) respectively. These results show that the extract of the guava leaves has good anti-radical activity.

**Keywords:** *Psidium guajava* L., phenolic compounds, flavonoids, carotenoids, tannins antioxidant activity, DPPH, phosphomolybdate and iron chloride.

## ملخص

في هذه الدراسة، تم تحديد الظروف المثلى لاستخراج المركبات الفينولية من أوراق *Psidium guajava* L. من خلال دراسة آثار المعلمات السبعة، وهي: طبيعة مذيب الاستخراج، وتركيز المذيب، (تباين كمية المسحوق، تباين حجم المذيب، درجة حرارة الاستخراج، وقت الاستخراج وأخيراً، عدد الاستخراج. الظروف المثلى لاستخراج المركبات الفينولية هي: مذيب الإيثانول بتركيز 45 %، والنسبة الصلبة / السائل من (10/1) (جم / مل)، ودرجة الحرارة عند (20 درجة مئوية)، ووقت استخراج الوقت من 2 ساعة والاستخراج الأول. في ظل هذه الظروف المحسنة، يبلغ الحد الأقصى للمحتوى التجريبي للمركبات الفينولية الكلية 150.35 ملغم EAG / جم، والفلافونويدات 21.20 ملغم مكافئ / جم، التانينات 0.87 ملغم EC / جم والكاروتينات من 10.37 ملغم Eβ-car / ملغم. تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة في استخراج المسحوق المدروسة من خلال ثلاثة اختبارات كشفت عن وجود قيم قريبة. في الواقع، فإن EC50 التي تم الحصول عليها هي في حدود 2.35 ملغم / مل، (DPPH.) 3.84 ملغم / مل (تخفيض F3 +) و3.48 ملغم / مل (تقليل فسفومولبيدات). توضح هذه النتائج أن مستخلص نبات الجوافة يعد مصدرًا جيدًا لمضادات الأكسدة مع أنشطة مضادات الأكسدة المثيرة للاهتمام والتي تتأثر بالعوامل المسببة.

الكلمات المفتاحية: *Psidium guajava* L، مركبات الفينول، أنشطة مضادة للأكسدة، معلمات الاستخراج، الخواص الفيزيائية والكيميائية.

