

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie Appliquée



Réf :.....

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

MASTER

Thème

*Optimisation des conditions de
fractionnement sur CCM des extraits de
feuilles de goyave*

Présenté par :

GOUGAM Wafa

Soutenu le : **15 septembre 2022**

Devant le jury composé de :

Mme CHAHER-BAZIZI. N	MCA	Présidente
Mme AOUDIA. H	MCB	Encadrante
Mme BOUDJOU. S	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2021/2022

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à mes parents qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années d'études.

A ma chère tante Nora, pour son aide et son encouragement.

A mes chers frères Hamza, Tarik, Zahir, Toufik et Samir

A ma chère sœur Warda

Pour leur aide, leur présence et leur soutien.

A tous mes amis surtout :

Aida, Massilia et Youcef à qui je tiens beaucoup, et qui m'ont accompagné et encouragé durant ces années.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Remercîments

Dans cet espace qui m'est réservé, je tiens à présenter mes profonds remerciements à tous ceux qui ont collaboré pour la réalisation de cet humble travail, notamment :

Mon encadrante, Mme AOUDIA pour sa disponibilité, ses conseils précieux et son grand dévouement pour l'achèvement de ce mémoire.

L'honorable jury composé de Mme CHAHER-BAZIZI présidente, et de Mme BOUDJOU, examinatrice, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Ma gratitude va également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur le goyavier

I.1. Nomenclature	3
I.2. taxonomie.....	3
I.3. Description botanique	3
I.4. Répartition géographique et production du goyavier.....	5
I.4.1. Dans le monde.....	5
I.4.2. En Algérie	6
I.5. Variétés	6
I.6. Biologie florale et reproduction	7
I.7. Ecologie	8
I.8. Composition et valeur nutritionnelle de la goyave	8
I.9. Utilisation du fruit en médecine traditionnelle	9
I.10. Ravageurs et maladies.....	10
I.11. Toxicité	11

II. Composition et activités des feuilles du goyavier

II.1. Composition chimique des feuilles du goyavier.....	12
II.1.1. Vitamine C.....	12
II.1.2. Les caroténoïdes	13
II.1.3. Composés phénoliques	13
II.2. Autres composants des feuilles du goyavier.....	16
II.3. Effets thérapeutiques des feuilles du goyavier	16

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal.....	20
I.1.1 Choix de la matrice	20

I.1.2 Origine	20
I.1.3. Préparation des échantillons.....	20
I.2. Les composés phénoliques.....	21
I.2.1. Extraction et dosage des composés phénoliques.....	21
I.2.2. Dosage des composés phénoliques	21
I.2.2.1. Dosage des composés phénoliques totaux	21
I.2.2.2. Dosage des composés phénoliques attachés à la paroi	22
I.2.3. Dosage des flavonoïdes.....	22
I.2.4. Dosage des tanins condensés	23
I.3. Fractionnement des extraits par chromatographie couche mince (CCM).....	23
I.3.1 Préparation des plaques.....	23
I.3.2. Fractionnement par CCM des extraits	24
I.3.3. Identification des fractions.....	24
I.3.4. Révélation par des méthodes chimiques.....	25
I.3.4.1. Révélation à la Vanilline sulfurique.....	25
I.3.4.2. Révélation au chlorure d'aluminium AlCl ₃	25
I.3.4.3. Révélation au chlorure de fer FeCl ₃	25
I.3.4.4. Révélation au Liebermann et Burchard	25
I.3.4.5. Révélation au KOH méthanolique	26
I.3.5. Test du pouvoir anti-radicalaire du DPPH sur plaque CCM	26
I.4. Analyse statistique	26

II. Résultats et discussion

II.1. Taux d'humidité	27
II.2. Teneurs en composées phénoliques.....	27
II.2.1. Teneurs en composées phénoliques totaux et tanins condensés.....	27
II.2.2. Teneur en flavonoïdes et composés phénoliques attachés à la paroi.....	28
II.3. Analyse des chromatogrammes par CCM	30
II.3.1. Caractérisation dans le système méthanol/ chloroforme/ acide acétique	30
II.3.2. Caractérisation dans le système toluène/ éthyle acétate/ méthanol	34
II.3.3. Caractérisation dans le système éthyle acétate/ méthanol/ eau	38
II.3.4. Caractérisation dans le système acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau	42
II.4. Test du pouvoir anti-radicalaire du DPPH sur plaque CCM	46
Conclusion.....	49

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Tableau I : Composition et valeur nutritionnelle de la goyave	9
Tableau II : Teneur en composés phénoliques et biochimiques des feuilles du goyavier	12
Tableau III : Systèmes d'élution testés.....	24
Tableau IV : Résultats de la chromatographie sur couche mince des standards utilisés sur gel de silice, chloroforme/ méthanol/ acide acétique	30
Tableau V : Résultats de fractionnement des extraits des feuilles de <i>Psidium guajava</i> dans le système d'élution chloroforme/ méthanol/ acide acétique	31
Tableau VI : Résultats de la chromatographie sur couche mince des standards utilisés sur gel de silice, toluène/ éthyle acétate/ méthanol.....	34
Tableau VII : Résultats de fractionnement des extraits des feuilles de <i>Psidium guajava</i> dans le système d'élution toluène/ éthyle acétate/ méthanol.....	35
Tableau VIII : Résultats de la chromatographie sur couche mince des standards utilisés sur gel de silice, éthyle acétate/ méthanol/ eau	38
Tableau IX : Résultats de fractionnement des extraits des feuilles de <i>Psidium guajava</i> dans le système d'élution éthyle acétate/ méthanol/ eau	39
Tableau X : Résultats de la chromatographie sur couche mince des standards utilisés sur gel de silice, acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau.....	43
Tableau XI : Résultats de fractionnement des extraits des feuilles de <i>Psidium guajava</i> dans le système d'élution acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau.....	45

Liste des figures

Figure 1: Description du goyavier: arbre (A); fleur (B); fruit (C), feuille (D).....	4
Figure 2 : Fruit du goyavier « la goyave »	5
Figure 3: Distribution géographique de la goyave	5
Figure 4 : Les variétés les plus fréquentes de la goyave en forme de pomme (A) et de poire (B).	6
Figure 5 : Différentes couleurs de la peau de la goyave	7
Figure 6 : Différentes couleurs de la pulpe de la goyave	7
Figure 7 : Quelques maladies et ravageurs de la goyave	11
Figure 8 : Structure de l'acide ascorbique.....	13
Figure 9 : Structure de β -carotène	13
Figure 10 : Structures de phénols simples.....	14
Figure 11 : Structure de base des flavonoïdes	15
Figure 12 : Structures d'un tannin hydrolysable et d'un tannin condensé	16
Figure 13 : Photographie des feuilles séchées et de la poudre de la goyave	20
Figure 14 : Teneur en CPT et tanins condensés des extraits des feuilles de la goyave.....	27
Figure 15 : Teneurs en CP attachés à la paroi et des flavonoïdes des feuilles de la goyave	29
Figure 16 : Chromatogrammes des extraits de feuilles de goyave à la lumière du jour (A), sous la lampe UV 365nm (B), après révélation avec la vanilline-acide sulfurique (C), avec le chlorure d'aluminium (D), avec le chlorure de fer (E), et après révélation avec le KOH.....	33
Figure 17 : Chromatogrammes des extraits de feuilles de goyave à la lumière du jour (A), sous la lampe UV 365nm (B), après révélation avec la vanilline-acide sulfurique (C) et avec le chlorure d'aluminium (D).....	37
Figure 18 : Chromatogrammes des extraits de feuilles de goyave à la lumière du jour (A), sous la lampe UV 365nm (B), après révélation avec la vanilline-acide sulfurique (C) et avec le chlorure d'aluminium (D).....	41
Figure 19 : Chromatogrammes des extraits de feuilles de goyave à la lumière du jour (A), sous la lampe UV 365nm (B), après révélation avec la vanilline-acide sulfurique (C), avec le chlorure d'aluminium (D), avec le chlorure de fer (E), et après révélation avec le KOH.....	45
Figure 20 : Test de l'activité anti-radicalaire du DPPH sur plaque CCM dans le système d'éluant acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau	47
Figure 21 : Test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM dans le système d'éluant (éthyle acétate/ méthanol/ eau).....	47

Figure 22 : Test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM dans le système d'éluant (acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau) 48

Liste des abréviations

ABS : Absorbance

AG : Acide gallique

Anova : Analysis of variance

CAT : Catéchine

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CFT : Composés Flavonoïques Totaux

CP : Composés phénolique

CPT : Composés Phénoliques Totaux.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

H(%) : Taux d'humidité

HCl : Acide chlorhydrique

KOH : Hydroxyde de potassium

Lj : Lumière de jour

MS : Matière sèche

PG : Psidium Guajava

pH : Potentiel hydrogène

Q : Quercétine

RF : Rapport frontale

UV : Ultraviolet

Introduction

L'utilisation de plantes pour leurs bienfaits date de la préhistoire. De nos jours, cette demande croit dans divers domaines tels que la médecine, la cosmétique, la pharmaceutique ou encore l'agro-alimentaire. En effet, certaines plantes ont de nombreuses vertus et renferment des composés actifs qui peuvent jouer un rôle positif pour la santé humaine. La recherche se focalise sur ces substances afin d'étudier leurs effets potentiels et de nombreuses recherches sont menées pour les extraire et les caractériser (**Gossell-Williams et al., 2006**).

De nombreuses études ont été menées sur les feuilles des plantes car se sont de riches sources d'antioxydants, tels que la vitamine A, la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes, les phénols et les flavonoïdes. Il a été rapporté que les flavonoïdes et les composés phénoliques largement distribués dans les plantes exercent de multiples effets biologiques, notamment des antioxydants, des propriétés anti-inflammatoires, anti-cancérigènes, etc (**Venkatachalam et al., 2012**).

L'espèce *Psidium guajava* est un exemple de plantes couramment utilisées en médecine populaire. De nombreuses études pharmacologiques ont démontré la capacité de cette plante à présenter des activités antioxydantes, hépatoprotectrices, antiallergiques, antimicrobiennes, antigénotoxiques, antiplasmodiales, cytotoxiques, antispasmodiques, cardioactives, antitussives, antidiabétiques, anti-inflammatoires et antinociceptives, soutenant ses utilisations traditionnelles. Ceci est attribué à sa richesse en antioxydants tels que la vitamine C et caroténoïdes qui sont d'une grande importance pour prévenir l'action des radicaux libres dans l'organisme (**Gutiérrez et al., 2008**).

L'obtention de ces principes actifs (phénols) à partir d'une matière végétale suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur pouvoir antioxydant, et doit passer par une extraction, qui est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des composés phénoliques. Leur solubilité dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Celle-ci est également affectée par la polarité du solvant utilisé (**Mahmoudi et al., 2013**).

Dans ce contexte, ce présent travail a pour objectif, d'une part, l'extraction, le dosage et la détermination des teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés des feuilles de *Psidium guajava*, et d'autre part, d'optimiser les conditions de fractionnement sur CCM des extraits obtenus en testant différents systèmes d'élution, et d'évaluer leurs activité antioxydante.

Pour ce faire, la première partie du manuscrit est divisée en deux chapitres, en premier lieu une étude bibliographique qui porte sur une description générale du goyavier, et en second sur la composition et les activités des feuilles de cette plante.

La deuxième partie consacrée aux travaux expérimentaux, présente la méthodologie d'extraction, de dosage et la détermination des teneurs en composés phénoliques des deux extraits aqueux et éthanolique des feuilles du goyavier. Par la suite, le fractionnement et la séparation de ces composés par CCM avec 5 systèmes d'élution ainsi qu'une évaluation de leur pouvoir antioxydant par le test de l'activité anti radicalaire du DPPH seront présentés.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le goyavier

I.1 Nomenclature

Le goyavier pomme ou prune de sable (*Psidium guajava*) appelé communément goyavier est une espèce d'arbre fruitier exotique de la famille des Myrtaceae, possédant environ 133 genres et plus de 3,800 espèces (Wilson et al., 2001).

Selon The Plant List (2016), *P. guajava* peut être connu par des synonymes tels que *Guajava pumila* (Vahl) Kuntze, *Guajava pyrifera* (L.) Kuntze, *Myrtus guajava* (L.) Kuntze, *Psidium angustifolium* Lam., *Psidium cujavillus* Burm.f., *Psidium cujavus* L., *Psidium fragrans* Macfad., *Psidium igatemyense* Barb. Rodr., *Psidium intermedium* Zipp. Ex Blume, *Psidium pomiferum* L., *Psidium prostratum* O. Berg, *Psidium pumilum* Vahl, *Psidium sapidissimum* Jacq., *Psidium vulgare* Rich. Et *Syzygium ellipticum* K. Schum. Et Lauterb (Morais-Braga et al., 2016).

I.2 Taxonomie

La classification scientifique de la goyave selon (Dakappa et al., 2013) est la suivante:

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidea

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : *Psidium*

Espèce : *Psidium guajava*

Dans le genre *Psidium*, il y a quatre espèces à fruits comestibles dont :

P.guajava est la plus importante dans les régions tropicales.

P.Cattleyanum Sabine, le goyavier-fraise, originaire du Brésil, à des fruits plus petits que *P.guajava* et est plus résistant au froid, sa distribution est très limitée en Afrique tropicale (POPENOE, 1974).

I.3 Description botanique

La goyave (*Psidium guajava* L.) est un petit arbre ou arbuste ramifié atteignant 7-10 m de hauteur (figure 1A) ayant un système racinaire superficiel, le tronc est ligneux, dur, avec une écorce tachetée lisse et pâle caractéristique qui se détache en fines lamelles. Une fois que le

tronc a atteint environ 20 cm de diamètre, les branches peuvent être ascendantes, étalées ou tombantes, ce qui donne différentes formes de couvert forestier (**Rodríguez et Herrero, 2016**), son feuillage persistant est composé de feuilles de forme oblongue de 15 cm de longueur et 7 cm de largeur (**figure 1D**). Les limbes (7-15 cm de long et 3-7 cm de large) sont quelque peu de forme ovale avec bouts arrondis ou pointus, ils ont des poils dessous et ont des marges entières. Chaque feuille a une nervure centrale proéminente et 10 à 20 paires de chaque côté (**Prabhudesai et al., 2019**).

Il produit de magnifiques fleurs blanches bisexuées, solitaires ou groupées par deux ou trois fleurs, d'environ 2,5 cm de diamètre aux étamines nombreuses et très pollinifères (**figure1B**) (**Pontikis, 1996**).

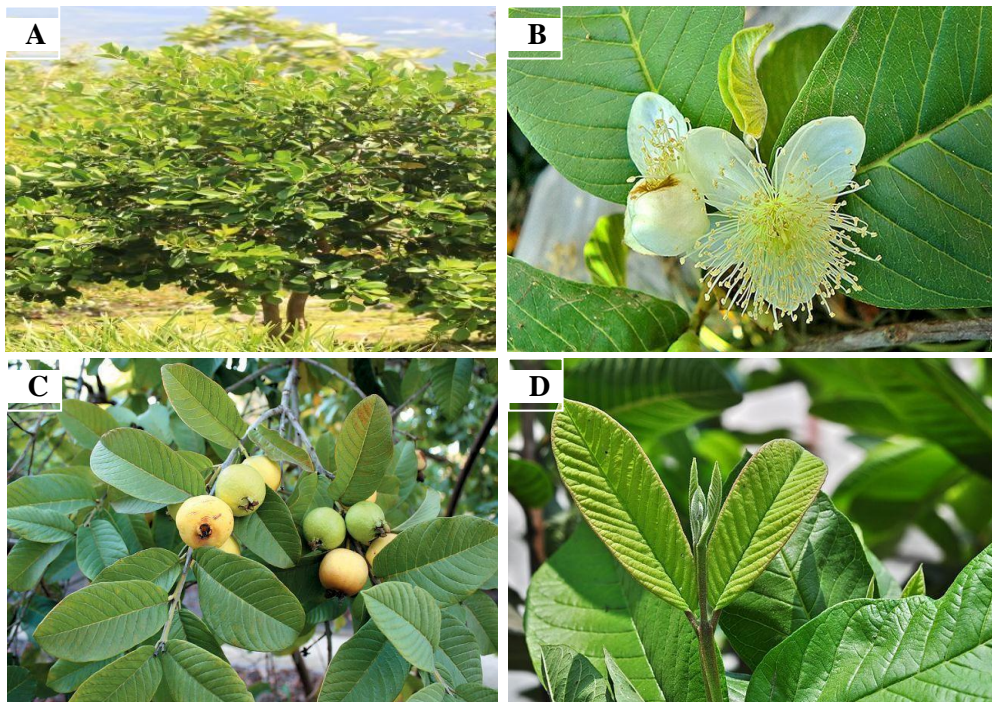


Figure 1 : Description du goyavier : arbre (A) ; fleur (B) ; fruit (C) ; feuille (D).

Le fruit est une baie globuleuse, ovoïde ou pyriforme (**figure2**) ses dimensions et sa taille varient énormément d'une variété à l'autre avec un diamètre allant de 3 à 10 cm, et parfois peut atteindre 12 cm dans certains cultivars. Sa peau (épluchure) est fine et fragile, avec une pulpe (chair) juteuse et fondante parsemée de petites graines, il a un arôme fort et caractéristique (saveur délicate, musquée, acidulée, rafraichissante) rappelant à la fois le goût de la pêche et de la fraise (**Bourdelles et Estanove, 1967**).

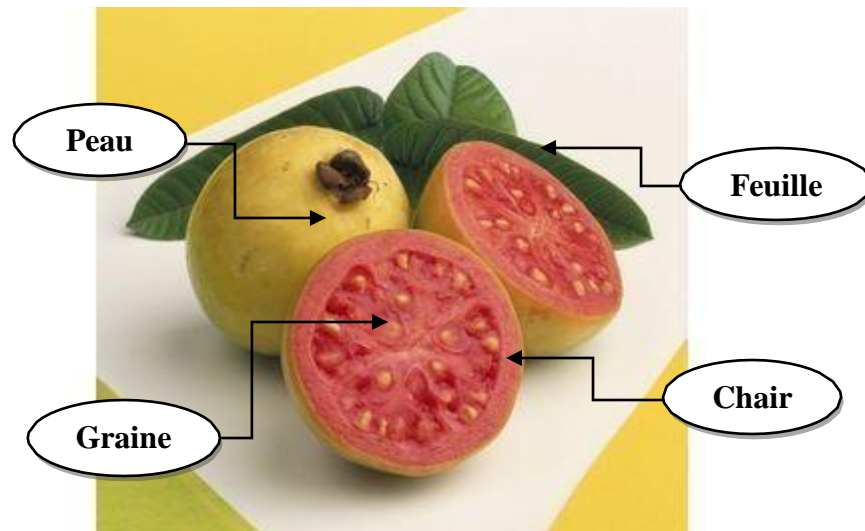


Figure 2 : Fruit du goyavier « la goyave ».

I.4 Répartition géographique et production du goyavier

I.4.1. Dans le monde

Psidium guajava est une espèce originaire du sud du Mexique et de l'Amérique centrale, introduite dans les tropiques américains, en Asie, en Afrique et dans les îles du Pacifique (figure 3), elle s'adapte à différentes conditions climatiques mais préfère les climats secs (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 (Vasquez et al., 2002).

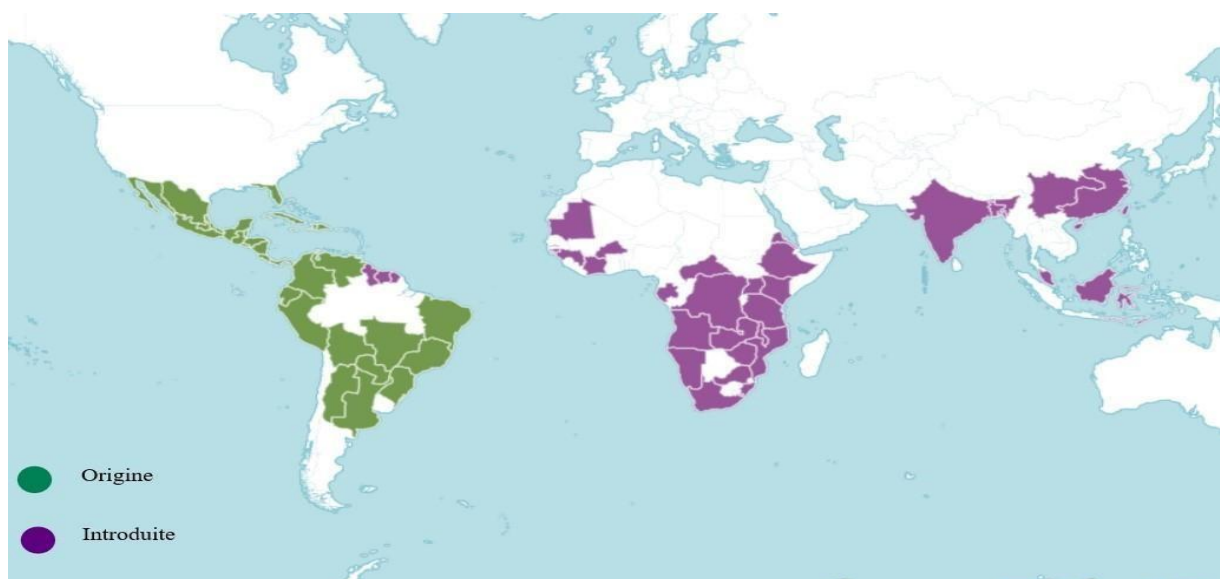


Figure 3: Distribution géographique de la goyave.

La goyave est l'un des fruits les plus exploités en région tropicale, il est souvent consommé frais ou transformé en jus et nectars. Sa production 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**).

I.4.2. En Algérie

En Algérie, on peut le trouver qu'à Fouka (Tipaza), appelé également « goyabes ». Selon le seul agriculteur en se spécialisant dans sa culture le Hadj Ahmed Hamada, elle a été introduite à la fin des années 1970 à raison d'expérimentation. 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 portant aujourd'hui le nom de domaine M'seguem-Abdelkader, sur la route de Douaouda. Il a été abandonné en 1987 puis repris en 1991 par Hadj Hamada pour pouvoir préserver ce fruit exotique. Aujourd'hui la récolte est près de 3 tonnes par an, commercialisés uniquement à Fouka ^[1].

I.5 Variétés

On compte 150 variétés de goyave dans le monde, toutes comestibles mais elles diffèrent beaucoup dans leurs aspects et leurs saveurs, les deux variétés les plus connues sont :

- La goyave (*P. guajava ssp pomiferum ou pomifera*) en forme de pomme (**figure 4 A**) elle possède une chair ferme de couleur rose saumon, dégageant un parfum musqué et de saveur douce.

- La goyave (*P. guajava ssp pyriferum ou pirifera*) en forme de poire (**figure 4 B**) possède une pulpe rose, jaune clair parfois blanche carnée et son goût est sucré. Comme la poire, sa pulpe est granuleuse et son parfum évoque la fraise (**Flores et al., 2013**).



Figure 4 : Les variétés les plus fréquentes de la goyave en forme de pomme (A) et de poire (B).

Ces baies sucrées rondes ou ovales possèdent une peau fine qui passe du vert pâle au jaune lorsqu'elle munit, et du rose au rouge chez certaines variétés (**figure 5**) (**Sahu et al., 2016**).



Figure 5 : Différentes couleurs de la peau de la goyave.

Quant à l'épaisseur de sa chair elle est variable, et la cavité centrale est garnie de graines nombreuses enrobées dans une masse pulpeuse. Selon les variétés la chair peut prendre différentes teintes (**Figure 6**) : blanche, blanche jaunâtre, rose plus au moins franc, rouge, jaune et saumon.



Figure 6 : Différentes couleurs de la pulpe de la goyave.

I.6 Biologie florale et reproduction

L'une des caractéristiques botaniques les plus critiques de la goyave est que les fleurs sont portées sur des pousses latérales nouvellement émergentes, quelle que soit la période de l'année.

Au cours de la première année suivant la plantation, les arbres propagés par clonage commencent souvent à produire et atteignent leur plein rendement après 5 à 8 ans selon les conditions de croissance et l'espacement. Le goyavier n'est pas un arbre à longue durée de vie (environ 40 ans), mais les plantes peuvent porter fortement pendant 15 à 25 ans. Les principaux agents de dispersion des fruits sont les chauves-souris, et les principaux pollinisateurs sont les abeilles. Le pollen est viable jusqu'à 42 heures et les stigmates sont réceptifs pendant environ 2 jours (**Orwa et al., 2009**).

I.7 Ecologie

La goyave évolue dans les zones ouvertes, telles que les zones de transition de savane/arbuste, ou dans des zones fréquemment perturbées où il est un concurrent important dans la croissance secondaire précoce. On peut trouver dans certaines grandes forêts jusqu'à 100 plantes sur une superficie de moins d'un demi-hectare, bien que souvent à des densités de 1 à 5 plantes/ha (Orwa *et al.*, 2009).

Elle s'adapte bien à une grande variété de sols, sauf ceux à forte teneur en argile, à faible capacité de drainage ou sur des sols acides et salins. Le sol optimum offre un bon drainage, un taux élevé de matière organique et un pH compris entre 5 et 7. Si le pH est supérieur à 7, la carence en zinc et en fer peut poser problème (Morais-Braga *et al.*, 2016).

Ainsi qu'elle peut supporter des températures allant de 15 à 45°C, avec des températures moyennes préférablement comprises entre 23 et 28°C. Le goyavier est plus résistant à la sécheresse que la plupart des arbres fruitiers tropicaux mais il s'épanouit le mieux avec 1000 à 2000 m³/ha de pluie répartie régulièrement sur l'année (Khadhri *et al.*, 2014).

I.8 / Composition et valeur nutritionnelle de la Goyave

La goyave est un fruit à grande valeur nutritionnelle. Peu chargé en sucre, sa teneur moyenne en glucides est d'ordre de 8,92g/100g de fruit, il est constitué de sucres simples : fructose (50%), glucose (40%) et saccharose (10%) qui sont responsables de l'essentiel de l'apport calorique, et les autres constituants énergétiques ne sont présents qu'en faibles proportions : 2,55g de protéines et 0,95g de lipides pour 100g de fruit (tableau I). La goyave fournit ainsi 68kcal/100g, un apport très modéré puisqu'elle se situe au niveau de celui de la framboise ou de la groseille, fruits réputés peu énergétiques (Chen *et al.*, 2007).

De plus, c'est une source riche en fibres diététiques (5,4g/100g) très présentes pendant la maturation du fruit et diminuent rapidement après murissement (Joseph et Priya, 2011).

La composition ainsi que la valeur nutritionnelle de la goyave (dans 100g du fruit) est présentée dans le tableau I.

Tableau I : Composition et valeur nutritionnelle de la goyave (Chen *et al.*, 2007).

Nutriments	Unités	Valeur par 100g	Nutriments	Unités	Valeurs par 100g
Eau	g	80.8	Vitamine C	Mg	228.3
Energie	Kcal	68	Niacine	Mg	1.084
Protéines	g	2.55	Vitamin B-6	Mg	0.11
Lipides	g	0.95	Folate, totale	mcg	49
Cendre	g	1.39	Vitamine A	IU	624
Carbohydate	g	14.32	Vitamine E	Mg	0.73
Fibre	g	5.4	Vitamine K	mcg	2.6
Sucre	g	8.92	Vitamine B1	Mg	0.067
Calcium	mg	18	Vitamine B2	Mg	0.040
Fer	mg	0.26	Vitamine B3	Mg	1.20
Magnesium	mg	22	Cuivre	Mg	0.23
Phosphate	mg	40	Manganèse	Mg	0.15
Potassium	mg	417	Sélénium	mcg	0.6
Sodium	mg	2	Beta Carotène	mcg	374
Zinc	mg	0.23	Lycopène	mcg	5204

La valeur nutritionnelle de la goyave est souvent incluse parmi les super fruits, riche en fibres alimentaires, en vitamines A et C, acide folique et en minéraux alimentaires, potassium, cuivre et manganèse, elle se caractérise par une teneur exceptionnelle en vitamine C : 228.3 mg en moyenne pour 100g, elle contient environ quatre fois plus de vitamine C que l'orange cette teneur situe la goyave largement en tête de l'ensemble des fruits frais commercialisés (Dakappa *et al.*, 2013). La vitamine C est une vitamine hydrosoluble qui joue un rôle important dans le métabolisme de l'être humain et de nombreux autres mammifères. Elle participe à de nombreux processus métaboliques et est active dans tout l'organisme. Dans certaines situations pathologiques (comme le stress, la dépression, l'inflammation, l'infection etc.) les besoins en vitamine C peuvent être accrus (Chiaburu et Ciobanu, 2018).

I.9 Utilisation du fruit en médecine traditionnelle

Diverses parties de la plante ont été utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement d'un certain nombre de maladies dans plusieurs régions du monde (Kaneria et Chanda, 2011).

▪ Plante entière

En général, la plante entière ou ses pousses sont utilisées sous forme d'infusion, de décoction et de pâte tonique pour la peau à Tahiti et Samoa et comme antalgique lors des menstruations douloureuses, de fausses couches, de saignements utérins, d'accouchement prématuré et de blessures.

▪ Épluchure

L'écorce sous forme de décoction et de cataplasme est utilisée comme astringent dans le traitement des plaies ulcéreuses et de la diarrhée aux Philippines alors qu'au Panama, en Bolivie et au Venezuela, l'écorce est utilisée dans le traitement de la dysenterie et des affections cutanées. Sous forme de décoction et de cataplasme, il est utilisé pour expulser le placenta après l'accouchement et dans les infections de la peau, les hémorragies vaginales, la fièvre, la déshydratation et les troubles respiratoires.

▪ Racine

La racine est utilisée en Afrique de l'Ouest en décoction pour soulager la diarrhée, la toux, les maux d'estomac, la dysenterie, les maux de dents, l'indigestion et la constipation. Tandis qu'aux Philippines, aux Fidji et en Afrique du Sud, les racines sont utilisées sous forme de décoction et de cataplasme comme astringent dans les plaies ulcéreuses et dans le traitement de la diarrhée.

▪ Feuilles

La décoction ou l'infusion des feuilles est utilisée comme fébrifuge, antispasmodique et pour les rhumatismes en Inde. Aux États-Unis elles sont utilisées comme antibiotique sous forme de cataplasme ou décoction pour les plaies, les ulcères et les maux dentaires.

La bronchite, les crises d'asthme, toux, les maladies pulmonaires pourraient également être traitées avec des thés de goyave (**Joseph et Priya, 2011**).

I.10 Ravageurs et maladies

Les insectes nuisibles sont nombreux et parfois sévères. Les asticots des mouches des fruits comme *Anastrepha striata*, *Dacus spp* et *Ceratitis spp* sont particulièrement gênants. Les pucerons (*Aphis spp.*) se nourrissent des jeunes pousses, provoquant l'enroulement des feuilles (**figure 7**).

Selenothrips rubrocinctus, le thrip à bandes rouges; les formes adultes et larvaires perforent les feuilles de l'arbre infesté et des taches brunâtres apparaissent. Les arbres fortement infestés sont parfois complètement défoliés.

Au Brésil, la rouille jaune (*Puccinia psidii*) est un ravageur fongique extrêmement grave, tout comme la tache foliaire (*Phyllosticha guajayae*) et l'anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*).

La cochenille verte (*Coccus viridis*) est présente sur les branches. La pourriture des fruits (*Glomerella cingulata*) ratatine les fruits verts et pourrit les fruits mûrs et celle des racines, des champignons (*Clitocybe tabescens*) peut éventuellement tuer l'arbre (**Orwa et al., 2009**).



Figure 7 : Quelques maladies et ravageurs de la goyave.

I.11 Toxicité

Le profil toxicologique indiquait que même le niveau de métaux toxiques dans la goyave est significativement faible et incapable de causer des dommages, ce qui en fait un bon candidat pour les études cliniques (**Prance, 2003**). Néanmoins, la consommation du fruit non mûr (fruit vert) peut provoquer des vomissements et des sensations de fièvre (**Ministre de santé du Congo, 2009**).

*Chapitre II: Composition et activités des feuilles
du goyavier*

II.1 Composition chimique des feuilles du goyavier

Les composés phytochimiques sont des composés chimiques dérivés de plantes qui sont des composés métaboliques secondaires non nutritifs présents dans différentes parties des plantes. Ils sont importants en tant que composés protecteurs et de lutte contre les maladies qui aident le corps à prévenir ou à lutter contre les maladies et sont donc nécessaires au corps humain pour maintenir la vie (**Offor, 2015**). Les analyses phytochimiques ont montré que les feuilles du goyavier sont riches en plusieurs composés tels que les tanins, phénols, triterpènes, flavonoïdes, saponines, caroténoïdes, lectines, et vitamines qui sont importants en tant que composés de protection et de lutte contre les maladies (**Gutierrez et al., 2008**). Le tableau ci-dessous résume quelques composés majeurs des feuilles du goyavier

Tableau II : Teneur en composés phénoliques et biochimiques des feuilles du goyavier

Composé	Teneur	Référence
Vitamine C (100mg/100g MS)	25±4,35	Nwozo et al., 2014
Flavonoïdes (CE mg/ 100g)	435,13±1,715	Nwozo et al., 2014
Les phénols (GAE mg/100g)	71,75±0,086	Nwozo et al., 2014
Quercétine (mg kg-1)	2883.08	Gutierrez et al., 2008
Tanins (mg/g)	1.72 à 2.35	Mailoa et al., 2013
Caroténoïde (mg/g)	8	Krishnaveni et al.,2013
CPT (mg EAG/g MS)	83,34±0,49	Ashraf et al., 2016.
CFT (µg QE/mg)	53,39-0,89	Ashraf et al., 2016.

II.1.1 Vitamine C (Acide ascorbique)

L'acide ascorbique (vitamine C) (**figure 8**) est considéré comme l'un des antioxydants naturels les plus puissants et les moins toxiques, C'est une vitamine hydrosoluble qui se trouve en fortes concentrations dans de nombreux aliments diététiques ou végétaux (**Gülçin, 2011**). Il comprend deux vitamères actifs, l'acide L-ascorbique et son produit de réduction à deux électrons acide deshydro-L-ascorbique, la plupart des espèces de plantes et d'animaux synthétisent l'acide ascorbique à partir du glucose, mais les sujets humains ne peuvent pas, faisant de la vitamine C un composant alimentaire essentiel (**Benzie, 1999**).

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

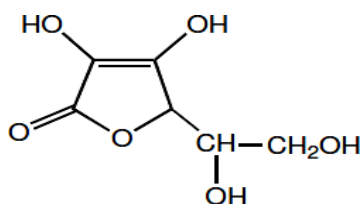


Figure 8 : Structure de l'acide ascorbique.

II.1.2 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments fabriqués par les végétaux généralement responsables des couleurs rouge, jaune et orange des fruits et légumes. Ils jouent un double rôle photoprotecteur essentiel dans les tissus verts et comme colorants à distribuer dans les fleurs et les fruits (Giuliano et al., 1993). Ils sont divisés en deux groupes : les carotènes et les xanthophylles. Carotènes, tels que α - carotène, β -carotène (Figure 9), γ - carotène et le lycopène sont des hydrocarbures. D'un autre côté, les xanthophylles, telles que la β -cryptoxanthine, la lutéine, la zéaxanthine, l'astaxanthine, la fucoxanthine et la périidine.

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

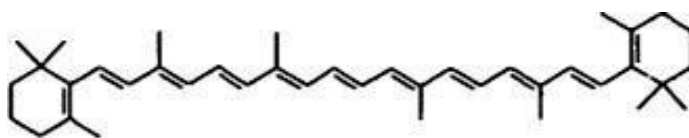


Figure 9 : Structure de β -carotène.

II.1.3 Composés phénoliques

Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent l'un des groupes de substances les plus nombreux et les plus répandus du règne végétal, avec plus de 8000 structures phénoliques actuellement connues. Ils se caractérisent par la présence d'un noyau benzénique,

portant un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une fonction ester, éther ou hétéroside. Leurs synthèses résultent de deux voies principales : la voie de shikimate et celle d'acétate (Lima et al., 2014).

L'extrait de poudre de feuille du goyavier présente un remarquable taux de phénols totaux de 575,3mg EAG/g MS pour l'extrait aqueux et 598.25 mg EAG/g MS pour l'extrait éthanolique (Qian et Nihorimbere, 2004).

- **Les phénols**

Les phénols simples (Figure 10) sont rares dans la nature. Les acides phénols sont des dérivés de l'acide benzoïque (composés en C6-C1) tel que l'acide gallique, élément constitutif des tanins hydrolysables ou de l'acide cinnamique (composés en C6-C3) comme l'acide caféïque qui sont souvent estérifiés (Krief, 2003).

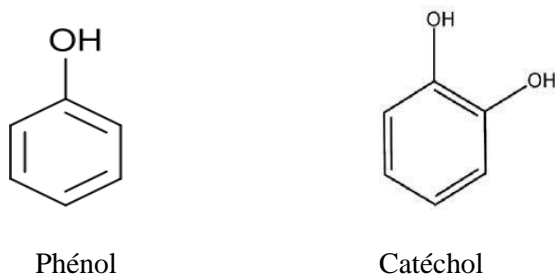


Figure10 : Structure de phénols simples.

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes (figure 11), ou bioflavonoïdes, sont un groupe omniprésent de substances polyphénoliques présentes dans la plupart des plantes, concentrées dans les graines, la peau ou la peau des fruits, l'écorce et les fleurs. Plus de 4000 flavonoïdes différents ont été identifiés à ce jour, ce qui en fait le plus grand groupe de produits chimiques végétaux (Malešev et Kunti, 2007). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Les flavonoïdes possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbone constitués de deux cycles aromatiques liés par trois atomes de carbone (C6-C3-C6), du point de vue structural, les flavonoïdes se répartissent en six classes : flavanols, flavones, flavanons, isoflavons et anthocyanidines.

Ils sont retrouvés dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant des flavonoïdes ont été (et sont) utilisés en médecine traditionnelle de par le monde (**Ghedira, 2005**).

Les feuilles du goyavier sont riches en flavonoïdes particulièrement la quercétine d'une teneur de (2883,08 mg/kg MS) (**Gutiérrez et al., 2008**).

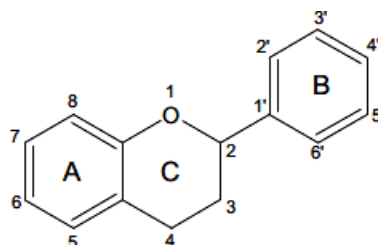


Figure11 : Structure de base des flavonoïdes.

- **Les tannins**

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Da, ils sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacées, les Rosacées. Ils peuvent exister dans presque chaque partie de la plante : l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (**Koleckar et al., 2008**), et sont classés en deux groupes basés sur des différences structurales : tannins hydrolysables et tanins condensés (**Figure 12**).

Des études ont montré que la teneur en tanins dans les feuilles du goyavier varie entre 2,351 à 3,228 mg/g MS (**Mailoa et al., 2013**).

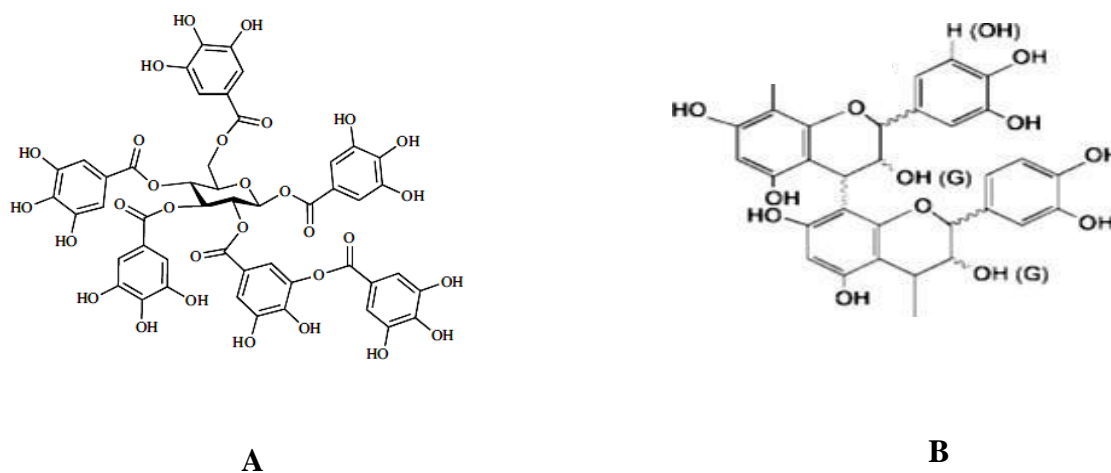


Figure 12 : Structure d'un tannin hydrolysable (A) et d'un tannin condensé (B).

II.2 Autres composants des feuilles du goyavier

Une étude a été réalisée sur la poudre de feuilles du goyavier, celle-ci a révélé une teneur élevée en glucides (54,53%), des niveaux modérés de protéines (18,64%), d'une humidité de (10,74%) et de fibres (10,37%) avec des niveaux faibles de cendres (4,35%) et de graisses (1,37%) (**Offor, 2015**).

Une autre analyse des métaux de l'échantillon en poudre de *Psidium guajava* a montré la présence de sept métaux : magnésium (0,64 mg/kg MS), manganèse (29,23 mg/kg MS), zinc (56,49 mg/kg MS), calcium (1,34 mg/kg MS), fer (16,18 mg/kg MS), sodium (0,05 mg/kg MS) et potassium (0,76 mg/kg MS) (**Okunrobo et al., 2010**).

II.3 Effets thérapeutiques des feuilles du goyavier

Les préparations de feuilles de goyave (*Psidium guajava* L.) ont traditionnellement été utilisées pour gérer plusieurs maladies. Elles possèdent des propriétés médicinales incomparables dues aux nombreuses substances actives qu'elles contiennent, les plus connues sont les polyphénols, les caroténoïdes, les flavonoïdes et les tanins.

La recherche pharmacologique in vitro ainsi qu'in vivo a été largement utilisée pour démontrer le potentiel des extraits de feuilles pour le co-traitement de différentes affections à forte prévalence dans le monde. Parmi les nombreuses propriétés de ces feuilles on distingue :

➤ Activité anti-microbienne

Les extraits de feuilles de *Psidium guajava* ont été testés pour leur potentiel antibactérien et se sont avérés efficaces contre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutatis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Proteus spp.* *Shigella spp.* et *Escherichia coli*; les principaux agents responsables des infections intestinales chez l'homme (**Sanda et al., 2011**)

➤ Activités anti-inflammatoire et analgésique

Une décoction de feuilles de *Psidium guajava* est utilisée dans le monde entier pour le traitement de diverses affections inflammatoires dont les rhumatismes. Les nombreux composés polyphénoliques, triterpénoïdes et autres composés chimiques présents dans la plante peuvent expliquer les divers effets anti-inflammatoires et analgésiques de ces extraits de feuilles (**Gutiérrez et al., 2008**).

Les extraits méthanolique, chloroformique et d'éther de pétrole des feuilles de *Psidium guajava* (200 mg/kg de poids corporel) présentaient une activité analgésique significative chez les souris albinos suisses (**Maiga, 2014**).

➤ **Activité anti-oxydante**

L'activité antioxydante des feuilles du goyavier a été révélée par des dosages des antioxydants utilisant les méthodes FRAP et DPPH. Cette activité est associée aux composés phénoliques présents dans les feuilles du goyavier tels que l'acide protocatéchique, la quercétine, acide gallique, l'acide caféique et acide ascorbique, ce dernier était l'antioxydant le plus puissant des extraits de feuille de goyave (**Gutiérrez et al., 2008**).

➤ **Effet antitussif**

Une étude a montré que l'infusion d'eau à partir de l'extrait de feuilles de *P. guajava* diminue la fréquence de la toux induite par l'aérosol de capsaïcine. Cette même étude par l'infusion sur un muscle trachéal de rat isolé a montré une contraction musculaire directement stimulée et également synergisée avec l'effet stimulant de la pilocarpine ce qui traduit une action antitussive de l'extrait des feuilles (**Gutiérrez et al., 2008**).

➤ **Effet antidiarrhéique**

Une étude sur l'effet anti-diarrhéique de l'extrait aqueux de feuilles de *P. guajava*, qui a été sélectionné sur la base de son utilisation populaire, a été menée en utilisant *Mus musculus* comme modèle in vivo. 90 minutes après l'administration par gavage de l'extrait de *P. guajava*, une diminution significative des mouvements intestinaux a été observée chez les souris, suggérant que l'extrait aqueux de feuilles de *P. guajava* pourrait avoir des effets bénéfiques sur la diarrhée (**Salgado et al., 2006**).

➤ **Activité hépatoprotectrice**

Un extrait aqueux de feuilles de goyave a été étudié sur les lésions hépatiques de rat induites par le tétrachlorure de carbone en surveillant la transaminase sérique, la phosphatase alcaline, le cholestérol sérique, les lipides sériques totaux et les altérations histopathologiques. L'extrait de feuilles à des doses de 500 mg/kg produit une hépatoprotection significative. En effet, l'induction de dommages des cellules de foie saines a indiqué les propriétés hépatoprotectives des extraits de feuilles (**Gutiérrez et al., 2008**).

➤ **Effet cardio-protecteur**

Une étude réalisée sur des cœurs isolés de rats a montré qu'un extrait aqueux de feuilles de *Psidium guajava* présentait des activités cardioprotectives contre les lésions myocardiques d'ischémie-reperfusion. L'augmentation des antioxydants endogènes, le maintien du statut antioxydant du myocarde et la restauration significative de la plupart des paramètres hémodynamiques modifiés peuvent avoir contribué à son effet cardioprotecteur (**Gutiérrez et al., 2008**)

➤ **Activité hypotensive**

Une autre étude a également démontré que l'administration intraveineuse aiguë d'extrait de feuille du goyavier (50 à 800 mg/kg) a produit des réductions significatives et dépendantes de la dose de la pression artérielle systémique et de la fréquence cardiaque des hypertendus (**Gutiérrez et al., 2008**).

➤ **Effets anticancéreux et anti tumoraux**

Certains rapports récents ont indiqué que *Psidium guajava* possède une activité anticancéreuse. En effet l'extrait aqueux de feuilles de *P. guajava* a inhibé la viabilité de la lignée cellulaire cancéreuse DU-145 de manière dose dépendante à 1,0 mg / ml, l'extrait a réduit la viabilité du Pca DU-145 (les cellules Pca indépendantes des androgènes) à 36,1% et 3,6%, respectivement après 48 et 72h d'incubation. Il a été rapporté selon une étude sur un extrait de feuilles au méthanol qu'il réduisait considérablement l'incidence des tumeurs. Ces résultats suggèrent que les extraits de *Psidium guajava* L. ont le potentiel d'être développés en tant que nouvel agent chimiothérapeutique pour inhiber la croissance des tumeurs et des cancers (**Sanda et al., 2011**).

➤ **Effet anti-hyperglycémique**

Les extraits de feuilles de *Psidium guajava* ont montré une activité hypoglycémiant chez des rats diabétiques induits par l'alloxane. Dans les tests aigus et subaigus, l'extrait a montré une activité hypoglycémiant significative. Une autre étude a révélé que le traitement avec l'extrait aqueux de feuilles de *Psidium guajava* L. (0,01-0,625 mg mL⁻¹) a également montré une inhibition significative de la glycation des LDL de manière dose-dépendante. Les tanins, les flavonoïdes, les triterpénoïdes pentacycliques, la guajaverine, la quercétine et d'autres composés chimiques présents pourraient expliquer les effets hypoglycémiant et hypotenseurs observés de l'extrait de feuille (**Sanda et al., 2011**).

➤ **Autres effets**

Aux États-Unis, les extraits de feuilles de goyave sont utilisés dans diverses formules à base de plantes à des fins multiples : de formules d'antibiotiques et de diarrhée aux formules de santé intestinale et de perte de poids (**Gutiérrez et al.,2008**).

En Uruguay, une décoction de feuilles peut aussi servir à nettoyer le vagin et l'utérus, en particulier dans les leucorrhées (**Sahu et al., 2016**).

Partie expérimentale

Chapitre I: Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Choix de la matrice

Le choix de cette matrice à savoir le goyavier, plus particulièrement ses feuilles, réside dans la richesse de ces dernières en composés phénoliques ce qui explique leur grand usage en médecine dans plusieurs régions du monde, et dans la valorisation de cette espèce méconnue auprès de notre population.

I.1.2 Origine

Les feuilles de *Psidium guajava* étudiées dans cette présente étude proviennent de chez un particulier, adepte des fruits exotiques, de la région d'Aokas située sur le littoral méditerranéen, à environ 28 km à l'est de Bejaia. La récolte de la matrice végétale a été effectuée durant la période octobre-novembre 2017.

I.1.3. Préparation des échantillons

a) Séchage

Après la récolte, les feuilles sont rincées de la poussière puis étalées à l'air libre pour le séchage, elles ont été mises dans une étuve à 40°C pendant 2 jours en moyenne.

b) Broyage et tamisage

Après séchage, les feuilles sèches ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique (SKANEX, Chine) jusqu'à obtention d'une poudre fine (**figure 13**). Cette dernière a été par la suite tamisée à l'aide d'un tamiseur électrique (Retsch, Allemagne) 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 13 : Photographie des feuilles séchées et de la poudre de la goyave.

c) Test d'humidité :

La teneur en humidité a été réalisée par la méthode de **Afroze et al., (2015)**. Une quantité de 0.5g de poudre des feuilles de *Psidium guajava* pesée avec précision a été déshydratée dans une étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le calcul du taux d'humidité (H%) a été établie selon la formule suivante :

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

Avec :

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

P_{av} : Poids de l'échantillon avant séchage (g).

P_{ap} : Poids de l'échantillon après séchage (g).

I.2. Les composés phénoliques**I.2.1. Extraction des composés phénoliques**

Pour extraire les polyphénols des feuilles du goyavier, nous avons opté pour le protocole décrit par **Al-Farsi et al (2005)**, en utilisant de l'éthanol (45%) et à l'eau distillée comme solvants d'extraction.

➤ Mode opératoire

1g de poudre de feuilles du goyavier a été macéré dans 10ml de solvant d'extraction sous agitation magnétique à température ambiante pendant deux heures.

Après filtration du mélange sur papier wattman à l'aide d'une pompe à vide, les filtrats sont centrifugés à 6000 t/min pendant 10 min.

Les filtrats obtenus ont été conservés au frais et les résidus ont été récupérés pour réaliser une attaque avec 100 ml de NaOH (1N) pendant 20heures, afin d'effectuer un dosage des composés phénoliques attachés aux parois.

I.2.2 Dosage des composés phénoliques**I.2.2.1. Dosage des composés phénoliques totaux****➤ Principe**

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (FC) : le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide

phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

➤ Mode opératoire

L'estimation de la teneur en composés phénoliques totaux des extraits des feuilles de goyavier a été déterminée selon la méthode décrite par **Alimi et al., (2011)**.

Un volume de 2ml de Na_2CO_3 à 2 % a été additionné à un volume de 100 μ L de chaque extrait (avec dilution convenable), ce mélange a été agité puis incubé pendant 2 min à température ambiante.

Après incubation, 100 μ L de réactif du Folin-Ciocalteu dilué (50/50 v/v) ont été ajoutés au mélange. Ce dernier a été incubé à l'obscurité pendant 30min. L'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre contre un blanc à 760 nm.

Les concentrations en phénols totaux solubles sont déterminées par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique (**Annexe 1**). Les résultats sont exprimés en mg EqAG/g de matière sèche.

I.2.2.2. Dosage des composés phénoliques attachés à la paroi

➤ Principe

Le dosage des polyphénols attachés à la paroi a également été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (expliqué précédemment).

➤ Mode opératoire

L'estimation de la teneur en composés phénoliques attachés à la paroi a été déterminée selon la méthode décrite par **Alimi et al (2011)**. Le mode opératoire est similaire à celui des CPT (avec dilution convenable).

I.2.3. Dosage des flavonoïdes

➤ Principe

Le principe de la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium est que le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) forme des complexes avec les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. Il résulte de cette réaction une coloration jaunâtre avec un maximum d'absorption à 430nm (**Lagnika, 2005**).

➤ Mode opératoire

Le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué selon la méthode décrite par **Djeridane et al., (2006)**, 1ml d'une solution d' AlCl_3 à 2% a été ajouté à un volume de 1mL d'extrait (avec dilution convenable).

Le mélange est homogénéisé et incubé pendant 15min à température ambiante. Ensuite l'absorbance a été mesurée contre un blanc à 430 nm.

La teneur en flavonoïdes est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec de la quercétine (**Annexe 1, Figure 2**). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par g de matière sèche (mg EqQ/gMS).

I.2.4 Dosage des tanins condensés

➤ Principe

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

➤ Mode opérationnel

Un volume de 2,5ml de la solution butanol-HCl (**Annexe 3**) est ajouté à un volume de 250 μL de chaque extrait (avec dilution convenable). Après homogénéisation, le mélange a été incubé à l'obscurité dans un bain marie à 95°C pendant 50 min. La lecture de l'absorbance a été réalisée au spectrophotomètre contre un blanc à 530 nm.

La teneur en tanins condensés est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue avec la catéchine. Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EqCat/g MS).

I.3. Fractionnement des extraits par chromatographie couche mince (CCM)

I.3.1 Préparation des plaques

Des plaques en verre (20cm sur 20cm) sont rincées auparavant avec du méthanol et séchées. Par la suite, elles sont recouvertes de gel de silice (60%) pour avoir une épaisseur de 0.5mm. Les plaques sont séchées à l'air libre, puis activées dans une étuve à 110°C pendant 15min.

Une fois les plaques activées, les dépôts sont effectués en bas de la plaque à 1cm du bord inférieur, les différents dépôts sont espacés de 2cm en laissant 1.5cm aux deux extrémités latérales.

I.3.2. Fractionnement par CCM des extraits

Lors du dépôt des échantillons sur la plaque qui sera mise par la suite dans une cuve à CCM, l'éluant va monter à travers la phase stationnaire par capillarité, et les différents composés vont se déplacer de la phase stationnaire à la phase mobile avec des différentes vitesses qui dépendent des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire, et de sa solubilité dans la phase mobile.

Cinq systèmes d'éluion (**Tableau III**) ont été testés afin de choisir l'éluant le plus efficace pour la séparation des composés des extraits de feuilles de *Psidium guajava*.

Tableau III : Systèmes d'éluion testés

Système d'éluion	Mesures	Référence
Chloroforme/ Méthanol/ Acide acétique (5%)	60 :40 :5	Bitencourt et al., 2014
Toluène/ Ethyle acétate/ Méthanol	5 :3 :2	Srinivasa et Ahmed., 2013
Ether de pétrole/ Acétate d'éthyle	2 :1	/
Ethyle acétate/ Méthanol/ Eau	100 :30 :10	/
Acétate d'éthyle/ Acide formique/ Acide acétique/ Eau	100 :11 :11 :26	Ramu et al., 2012

Par la suite des cuves à CCM ont été préparées une heure avant les manipulations, en versant 60 ml d'éluant dans une cuve qu'il faut par la suite fermé hermétiquement pour saturer l'atmosphère en vapeur de l'éluant.

I.3.3. Identification des fractions

➤ Dépôt de l'échantillon

Un volume de 20 µL de chaque extrait des feuilles de *P. guajava* (éthanol 45%, et eau distillée) sont déposés. 10 µL des standards suivants : Rutine, β-carotène, quercétine, acide caféique, acide tannique, acide ferrulique, acide ascorbique, catechine, syringic acid, acide coumarique préparés à raison de 1mg/1ml du solvant sont également déposées.

➤ Elution

Des plaques chargées d'échantillons ont été séchées à l'aide d'un sèche-cheveux et déposés dans la cuve qui est fermée immédiatement avec un couvercle adhésif. Lorsque l'éluion s'approche de la limite du bord supérieur à 1 cm, les plaques sont retirées de la cuve et le front du solvant est marqué à l'aide d'un crayon. Après séchage sous hotte, des différents spots sont observés à l'œil nu, sous UV et après révélation chimique.

Une fois les spots repérés et délimités, le rapport frontal (RF) de chaque constituant est déterminé comme suit:

$$\text{Le rapport frontal (RF)} = h / H$$

h: Distance parcourue par le constituant

H: Distance parcourue par le solvant

I.3.4. Révélation par des méthodes chimiques

La révélation a été réalisée par des méthodes chimiques qui consistent à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler.

I.3.4.1. Révélation à la Vanilline sulfurique

Une solution est préparée en mélangeant 1g de vanilline + 2ml d'acide sulfurique dans 100ml de méthanol. Après pulvérisation de la plaque avec la vanilline sulfurique, les terpènes apparaissent avec une couleur violet, rose ou orange à l'œil nu.

I.3.4.2. Révélation au chlorure d'aluminium AlCl₃

Une solution est préparée en mélangeant 1g d'AlCl₃ dans 100ml de méthanol. Après pulvérisation de la plaque avec le chlorure d'aluminium, les flavonoïdes apparaissent avec une couleur jaunâtre à l'œil nu et bleu, brun ou jaune-vert sous UV 366nm.

I.3.4.3. Révélation au chlorure de fer FeCl₃

Une solution est préparée en mélangeant 2g du FeCl₃ dans 100ml de méthanol. Après pulvérisation de la plaque avec le FeCl₃, les tanins apparaissent avec une couleur gris ou brun à l'œil nu.

I.3.4.4. Révélation au Liebermann et Burchard

Le réactif a été préparé en mélangeant 5ml d'acétique anhydride plus 5ml d'acide sulfurique concentré et 50ml d'éthanol, la solution est préparée à basse température et juste avant la pulvérisation des plaques avec le mélange. Après pulvérisation de la plaque avec le réactif de Liebermann et Burchard, les stérols apparaissent avec une couleur bleu ou jaune tandis que les triterpènes apparaissent avec une couleur bleu ou violet à l'œil nu et jaune, jaune-vert ou rouge sous UV 366nm.

I.3.4.5. Révélation au KOH méthanolique

Le réactif a été préparé en mélangeant 5g de KOH dans 100ml de méthanol. Après pulvérisation de la plaque avec Le KOH, les coumarines apparaissent avec une couleur jaunâtre à l'œil nu et des colorations diverses apparaissent sous UV 366nm.

I.4 Test du pouvoir anti-radicalaire du DPPH sur plaque CCM

La méthode **Cuendet *et al.* (1997)** citée par **Ferrari (2002)** est appliquée pour évaluer l'effet scavenger du radical DPPH sur plaque CCM.

Les plaques CCM développées et séchées sont vaporisées par une solution méthanolique de DPPH à 0,2 %. Après un temps de réaction optimal de 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière, les composés à propriété anti-radicalaire sont localisés par l'apparition de zones jaunes sur fond violet.

I.5 Analyse statistique

Toutes les déterminations sont répétées trois fois. Les résultats sont traités par l'analyse de la variance (ANOVA) à un seul facteur suivi d'une comparaison multiple des moyennes avec le test LSD grâce au logiciel STATISTICA (version 7.1). Les échantillons sont considérés statistiquement différents à $P < 0,05$.

Chapitre II: Résultats et discussion

II.1. Taux d'humidité

La teneur en humidité des feuilles obtenue après séchage à 105°C est de 10%. Ce résultat est très proche de celui d'**Offor (2015)** récoltée au Nigeria avec un taux d'humidité de 10,74%.

II.2. Teneurs en composés phénoliques

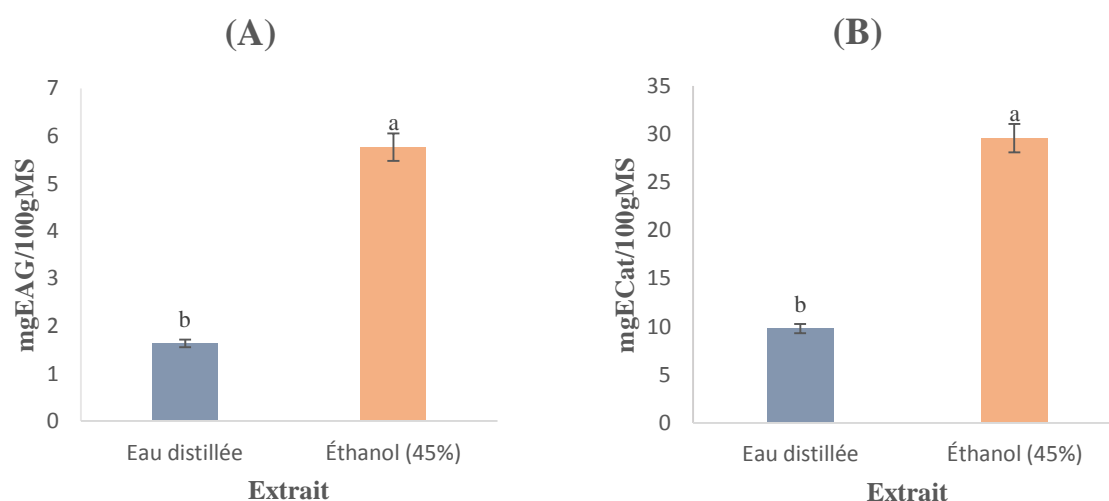
Dans ce travail, deux solvants d'extraction ont été utilisés, l'eau distillée et l'éthanol à 45%. Le choix de l'éthanol est justifié par les études précédentes confirmant son efficacité dans la solubilisation des composés phénoliques (**Mailoa et al., 2013**).

Nos différents tests analytiques mettent en évidence la présence de différentes classes de composés phénoliques (PTS, flavonoïdes, tannins condensés et CP attachés à la paroi) dans les extraits de feuilles de goyave.

L'analyse de la variance (**annexe 2**) montre que le facteur solvant mis en jeu exerce un effet significatif ($p < 0,05$) sur les teneurs enregistrés en différentes classes de composés phénoliques.

II.2.1. Teneur en composés phénoliques totaux et tanins condensés

Les résultats illustrés par la **Figure 14**, montrent que le contenu en phénols totaux et tanins de l'extrait éthanolique (45%) est largement supérieur par rapport au contenu des extraits aqueux.



a,b : représente les différences significatives a $P < 0,05$

Figure 14 : Teneur en CPT (A) et tanins condensés (B) des extraits des feuilles de la goyave.

A l'issue des dosages effectués, les résultats révèlent une variabilité de teneur entre les deux extraits de feuilles à l'éthanol 45% qui exprime un contenu en phénols totaux ($5,76 \pm 0.23$ mg/g ech) et tanins condensés ($29,55 \pm 0.25$ mg/100g MS) plus élevé par rapport à l'extrait aqueux ($1,63 \pm 0.02$ mg/g ech) et ($9,80 \pm 0.18$ mg/100g MS) pour les CPT et les tanins condensés respectivement.

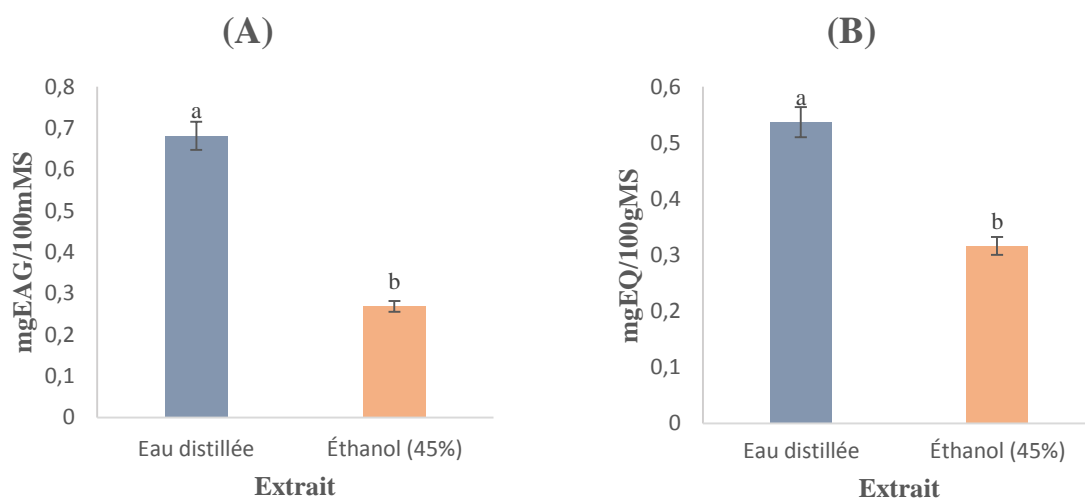
Globalement, les teneurs en phénols totaux solubles des extraits de feuilles de goyavier sont nettement supérieures à celles obtenue par **Nwozo et al., (2014)** pour des extraits de feuilles à l'éthanol 80%. Pour les tanins condensés les résultats obtenus ($29,55$ mg/g ech) montrent aussi des teneurs plus élevées à celle (1.72 à 2.35 mg/100g MS) trouvées par **Mailoa et al., (2014)** avec l'éthanol (30%, 50%, 70%).

En effet, les feuilles de goyave possèdent des teneurs importantes en composés phénoliques et en tanins condensés (**Gutierrez et al., 2008**). Selon **Mailoa et al., (2013)**, le rendement d'extraction est meilleur en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction pour les tanins.

Selon **Elias (1979)**, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. Mais aussi en raison de l'implication de divers facteurs dans l'évaluation des teneurs en composés phénoliques à savoir, l'origine géographique de la matière première.

I.2.2. Teneur en flavonoïdes et composés phénoliques attachés à la paroi

Les résultats des dosages des flavonoïdes (**Figure 15 A**) et des composés phénoliques attachés à la paroi (**Figure 15 B**) montrent des teneurs élevées en flavonoïdes ($0,54 \pm 0.004$ mg EQ/100g MS) et CP attachés aux parois ($0,68 \pm 0.006$ mg EAG/100g MS) comparativement à l'extrait éthanolique qui a exhibé des valeurs plus faible en terme de ces composés ($0,32 \pm 0.006$ mg EQ/100g MS) et ($0,27 \pm 0.004$ mg EAG/100g MS) pour les flavonoïdes et les CP attachés aux parois respectivement.



a,b : représente les différence significatives a $P < 0,05$

Figure 15 : Teneurs en CP attachés à la paroi (A) et des flavonoïdes (B) des feuilles de la goyave

Une augmentation de la solubilisation des tanins et des CPT a été observée dans l'extrait éthanolique de feuilles étudiées, leurs teneurs sont multipliées par 3.02 à 3,53 respectivement par rapport à l'extrait aqueux. Tandis que le phénomène inverse (eau distillée > éthanol 45%) a été observé pour la solubilisation des flavonoïdes et des composés phénoliques attachés à la paroi.

Ces résultats obtenus (flavonoïdes) montrent des teneurs inférieures en comparaison à celle de **Nwozo et al., (2014)** pour des extraits de feuilles de goyave à l'éthanol 80%.

La variabilité des teneurs entre les deux extraits dépend principalement de la nature du solvant d'extraction. **Seo et al., (2014)** ont rapporté que les composés polaires, tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes, étaient plus solubles dans les solvants aqueux que dans les solvants organiques. Les différences des teneurs en composés phénoliques obtenues se confirment avec les données de (**Mailoa 2013 et Seo 2014**) qui se distinguent selon la nature du solvant utilisé.

II.3. Analyse des chromatogrammes par CCM

L'analyse chromatographique des différents extraits a mis en évidence la présence de spots dont le nombre varie en fonction des extraits testés et du système d'éluant utilisés. Ces spots se distinguent entre eux par la valeur du rapport frontal (RF) et leur coloration avant et après révélation. **Ribéreau Gayon (1968)** a rapporté que les valeurs de RF sont propres à chaque composé phénolique et système d'éluant. Les résultats du criblage chimique obtenus sur plaque

CCM confirme la présence et la variabilité des composés solubilisés par les différents solvants utilisés.

II.3.1. Caractérisation dans le système chloroforme/ méthanol/ acide acétique (5%) (60 :40 :5)

Les principales caractéristiques (RF et coloration) des standards utilisés sont résumées dans le tableau IV. Nous notons une variabilité de la valeur du RF (0.62 à 0.98) et de la couleur des spots obtenus.

Tableau IV: Résultats de la chromatographie sur couche mince des standards utilisés sur gel de silice, dans le système d'éluant chloroforme/méthanol/acide acétique.

Standard	RF	Couleur a l'œil nu	Couleur sous UV
Rutine	0.75	Jaune	Mauve
B-carotène	0.98	Orange	Violet
Quercétine	0.97	Jaune	Mauve
Acide caféique	0.98	Beige	Bleu fluorescent
Acide tannique	0.62	Gris clair	Invisible
Acide ferrulique	0.95	Rose clair	Bleu fluorescent
Catechine	0.83	Jaune orange	Mauve

L'éluant des plaques par le chloroforme/ méthanol/ acide acétique (5%) met en évidence 10 fractions inégalement réparties entre les deux extraits notées FA1 à FA4 pour l'extrait aqueux et FE1 à FE6 pour l'extrait éthanolique selon la valeur du RF et la coloration (Tableau V).

Tableau V : Résultats de fractionnement des extraits des feuilles de *Psidium guajava* dans le système d'élution : chloroforme/méthanol/acide acétique (5%).

	RF	Œil nu	Sous UV	Vanilline-H ₂ SO ₄	AlCl ₃	FeCl ₃	Liebermann Burchard	KOH	EA	EE	Composé probable
FA1	0.22	Brun	Mauve	Brun rosé	brun	Invisible			+	-	Terpène
FA2	0.80	Jaune brun	Mauve foncé	Invisible	jaune	Invisible		Jaune	+	-	Coumarine
FA3	0.85	Jaune verdâtre	Mauve	Invisible	Brun foncé	Invisible			+	+	Catéchine
FA4	0.96	Jaune verdâtre	Mauve	Invisible	Brun foncé	Gris clair	Jaune		+	+	Stérol
FE1	0.22	Brun	Mauve	Rouge brun	Brun	Gris foncé	Jaune		-	+	Stérol
FE2	0.45	Brun	Mauve	Invisible	brun	Invisible		Jaune	-	+	Coumarine
FE3	0.67	Jaune	Mauve foncé	Rose foncé	Brun	Gris foncé			-	+	Acide tannique
FE4	0.84	Jaune verdâtre	Mauve	Invisible	Brun foncé	Invisible			+	+	Catéchine
FE5	0.86	Jaune	Mauve Foncé	Invisible	Brun	Gris foncé	Jaune		-	+	Stérol
FE6	0.96	Jaune verdâtre	Mauve	Rose foncé	Brun foncé	Invisible			+	+	Terpène

+ : présence ; - : absence.

EA : extrait aqueux ; EE : extrait éthanolique.

Selon le RF Les fractions de l'extrait aqueux (FA1, FA3, FA4) sont probablement identiques aux fractions de l'extrait éthanolique (FE1, FE4, FE6) respectivement.

On note la présence d'autres fractions dans les deux extraits (FA2, FE2, FE3, FE5) caractérisées par des valeurs de RF variables (0,22 à 0,86) et des colorations différentes.

Le criblage chimique en CCM a permis de mettre en évidence la présence de fractions non phénoliques révélées par les tests effectués (Vanilline-acide sulfurique, Liebermann et Burchard, KOH). Il s'agirait des terpènes (FE1 à FE6), stérols (FA4 et FE1, FE5) et des coumarines (FA2 et FE2).

Les terpènes uniquement révélés dans l'extrait éthanolique sont visibles à l'œil nu, ils affichent une coloration rosâtre et des valeurs de RF variables (0.22 à 0.96).

Les stérols et les coumarines sont révélés dans les deux extraits. Ils affichent une coloration jaunâtre à l'œil nu et des valeurs de RF (0.22, 0.85, 0.67, 0.84) pour les stérols et (0.22, 0.45) pour les coumarines.

Les fractions phénoliques révélées par les différents tests CCM regroupent deux classes de composés:

- les flavonoïdes, (FA3 et FE4) des deux extraits avec un rapport frontale de 0.85 et 0.84 et d'une coloration jaune verdâtre à l'œil nu et s'identifie à la catéchine utilisée comme standard. Ces fractions sont mises en évidence par le test avec le chlorure d'aluminium (coloration jaune à l'œil nu).
- les tanins, présence d'un spot dans l'extrait éthanolique (FE3) avec un rapport frontal de 0.67 et d'une coloration jaunâtre semble correspondre à l'acide tannique. Cette fraction est mise en évidence par le test du FeCl₃ (coloration grise ou brune à l'œil nu).

Les profils chromatographiques d'élution au système chloroforme/ méthanol/ acide acétique (5%) des extraits aqueux et éthanolique sont présentés dans la (**Figure 16**).

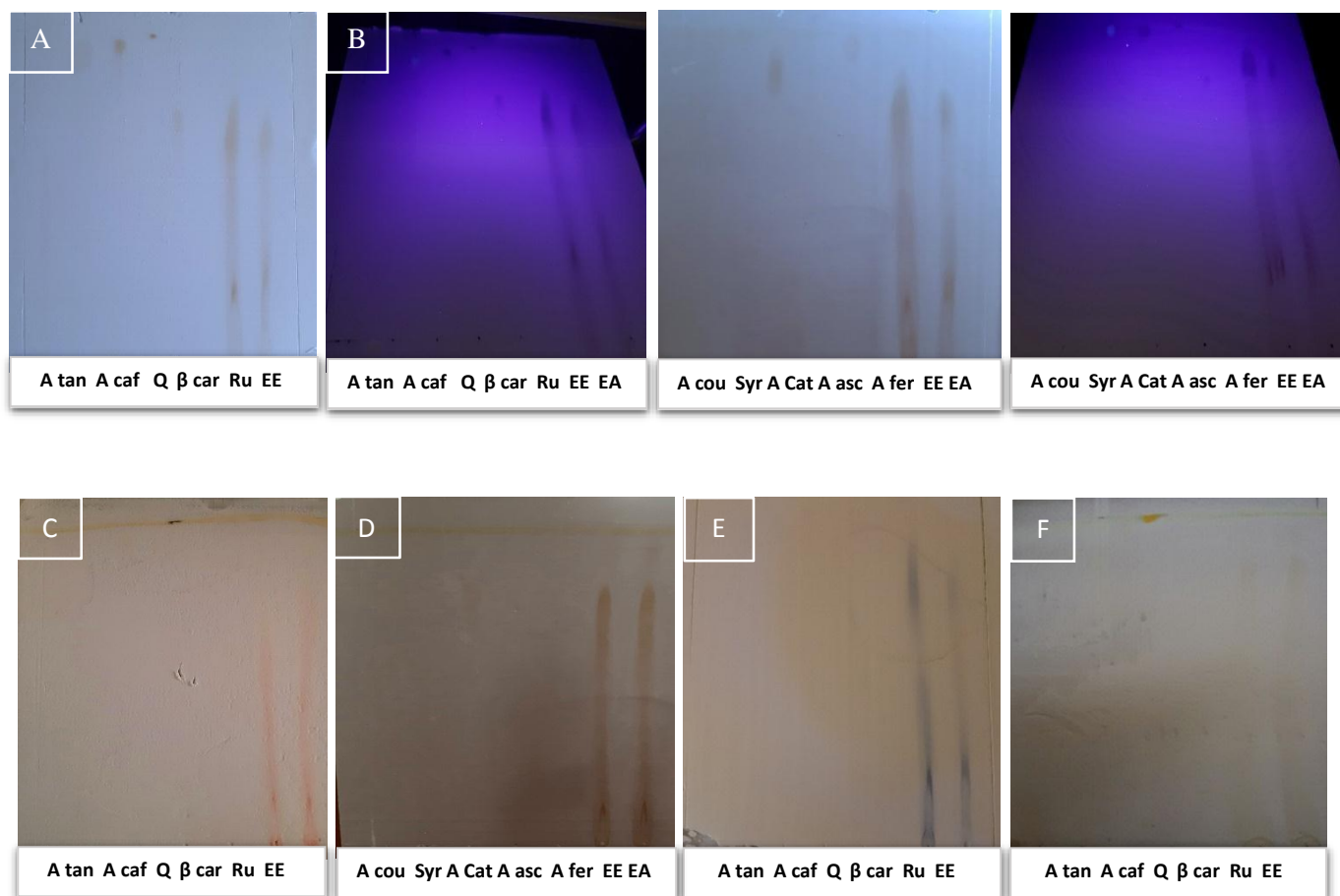


Figure 16 : Chromatogrammes des extraits de feuilles de goyave à la lumière du jour (A), sous la lampe UV 365nm (B), après révélation avec la vanilline-acide sulfurique (C), avec le chlorure d'aluminium (D), avec le chlorure de fer (E), et après révélation avec le KOH.

EA : Extrait aqueux; EE : Extrait éthanolique; Ru : rutine; β car : β-carotène; Q : quercétine; A caf : acide caféique; A tan : acide tannique; A fer : acide ferrulique; A asc : acide ascorbique; Cat : catechine; Syr A : syringic acid; A cou : acide coumarique.

II.3.2. Caractérisation dans le système toluène/ éthyle acétate/ méthanol (5 :3 :2)

Les principales caractéristiques (RF et coloration) des standards élués dans le système d'éluion toluène/ éthyle acétate/ méthanol sont résumés dans le tableau VI. Nous notons une variabilité de la valeur du RF (0.16 à 0.97) et de la couleur des spots obtenus.

Tableau VI : Résultats de la chromatographie sur couche mince des standards utilisés sur gel de silice, toluène/ Ethyle acétate/ Méthanol.

Standard	RF	Couleur a l'œil nu	Couleur sous UV
Rutine	0.16	Jaune	Mauve
B-carotène	0.97	Orange	Violet
Quercétine	0.70	Jaune	Mauve
Acide caféique	0.62	Beige	Bleu nuit
Acide ferrulique	0.13	Rose clair	Bleu
Catechine	0.64	Jaune	Bleu violacé

L'éluion des plaques par le toluène/ éthyle acétate/ méthanol met en évidence 8 fractions inégalement réparties entre les deux extraits notées FA1 à FA5 pour l'extrait éthanolique et FE1, FA2 pour l'extrait aqueux selon la valeur du RF et la coloration (Tableau VII).

Tableau VII : Résultats de fractionnement des extraits des feuilles de *Psidium guajava* dans le système d'élution : toluène/ Ethyle acétate/ Méthanol.

	RF	Œil nu	Sous UV	Vanilline-H ₂ SO ₄	AlCl ₃	FeCl ₃	Liebermann Burchard	EA	EE	Composé probable
FA1	0.16	Jaune	Beige	Invisible	Brun	Invisible		+	+	Rutine
FA2	0.63	Jaune orangé	Brun	Jaune	beige	Gris clair		+	+	Catéchine
FA3	0.91	Jaune clair	Invisible	Rose	Invisible	Invisible		+	+	Terpène
FE1	0.16	Jaune	Beige	Invisible	Brun	Invisible		+	+	Rutine
FE2	0.61	Jaune	Brun	Brun	Beige	Invisible	Brun foncé	+	+	Non identifié
FE3	0.62	Jaune	Fluorescent	Brun	Beige	Invisible		-	+	Acide caféique
FE4	0.70	Jaune	Mauve	Jaune	Invisible	Invisible	Brun clair	-	+	Quercétine
FE5	0.91	Jaune clair	Invisible	Rose	Invisible	Invisible		+	+	Terpène

+ : présence ; - : absence.

EA : extrait aqueux ; EE : extrait éthanolique.

Les fractions de l'extrait aqueux (FA1, FA2, FA3) sont probablement identiques à celle de l'extrait éthanolique (FE1, FE2, FE5),

L'analyse globale des données sur plaque CCM (à l'œil nu, sous UV et après révélation chimique) met en évidence la présence de terpènes dans les deux extraits (FA3 et FE5). Les terpènes révélés dans les deux extraits sont visibles à l'œil nu, ils affichent une coloration rosâtre avec un RF de 0.91.

Les fractions phénoliques révélées par les différents tests CCM regroupent trois classes de composés phénoliques :

- les flavonoïdes, (FA2 et FE3) des deux extraits avec un rapport frontal 0.16, 0.63 et 0.70 et d'une coloration jaunâtre à l'œil nu s'identifient à la rutine, la catéchine et la quercétine respectivement. Ces fractions sont mises en évidence par le test avec le chlorure d'aluminium (coloration jaune à l'œil nu).
- Les acides phénols, présence d'un spot dans l'extrait éthanolique (FE2) avec un rapport frontal de 0.62 et d'une coloration jaunâtre semble correspondre à l'acide caféique.

Les profils chromatographiques d'éluion au système toluène/ éthyle acétate/ méthanol des extraits aqueux et éthanolique sont présentés dans la **(Figure 17)**.



Figure 17: Chromatogrammes des extraits de feuilles de goyave à la lumière du jour (A), sous la lampe UV 365nm (B), après révélation avec la vanilline-acide sulfurique (C) et avec le chlorure d'aluminium (D).

EA : Extrait aqueux; EE : Extrait éthanolique; Ru : rutine; β car : β-carotène; Q : quercétine; A caf : acide caféique; A tan : acide tannique; A fer : acide ferrulique; A asc : acide ascorbique; Cat : catechine; Syr A : syringic acid; A cou : acide coumarique.

II.3.3. Caractérisation dans le système éthyle acétate/ méthanol/ eau (100 :30 :10)

Les principales caractéristiques (RF et coloration) des standards élués dans le système d'éluion éthyle acétate/ méthanol/ eau sont résumés dans le tableau VII. Nous notons une variabilité de la valeur du RF (0.62 à 0.98) et de la couleur des spots obtenus.

Tableau VIII : Résultats de la chromatographie sur couche mince des standards utilisés sur gel de silice, éthyle acétate/ Méthanol/ Eau.

Standard	RF	Couleur a l'œil nu	Couleur sous UV
Rutine	0.45	Jaune clair	Mauve
B-carotène	0.88	Orange	Brun orangé
Quercétine	0.80	Brun	Mauve
Acide caféique	0.51	Gris	Bleu foncé
Acide ferrulique	0.42	Rose clair	Fluorescence bleu clair
Catechine	0.93	Jaune	Brun
Syringic acid	0.33	Jaune clair	Mauve
Acide coumarique	0.54	Beige clair	Mauve

L'éluion des plaques par le système éthyle acétate/ méthanol/ eau met en évidence 7 fractions inégalement réparties entre les deux extraits notées FA1 à FA3 pour l'extrait aqueux et FE1 à FE4 pour l'extrait éthanolique selon la valeur du RF et la coloration (Tableau IX).

Tableau IX : Résultats de fractionnement des extraits des feuilles de *Psidium guajava* dans le système d'élution : éthyle acétate/ méthanol/ eau.

	RF	Œil nu	Sous UV	Vanilline-H ₂ SO ₄	AlCl ₃	FeCl ₃	Liebermann Burchard	EA	EE	Composé probable
FA1	0.53	Brun	Invisible	Invisible	Jaune foncé	Invisible		+	+	Acide coumarique
FA2	0.69	Jaune	Mauve Clair	Rose clair	Invisible	Gris clair		+	-	Non identifié
FA3	0.86	Jaune orangé	Brun	Brun rosé	beige	Invisible		+	-	Terpène
FE1	0.42	Jaune orangé	Brun	Brun	Brun	Invisible		-	+	Acide ferrulique
FE2	0.55	Brun	Mauve	Jaune	Beige	Invisible		+	+	Acide coumarique
FE3	0.81	Jaune	Mauve	Invisible	Jaune	Gris	Brun orangé	-	+	Quercétine
FE4	0.94	Jaune	Mauve foncé	Marron	Jaune	Invisible		-	+	Catéchine

+ : présence ; - : absence.

EA : extrait aqueux ; EE : extrait éthanolique.

La fraction de l'extrait aqueux FA1 semble être la même que celle de l'extrait éthanolique FE2. On note la présence d'autres fractions dans les deux extraits (FA2, FA3, FE1, FE3, FE4) caractérisées par des valeurs de RF variables (0.69 à 0,94) et des colorations différentes.

L'analyse globale des données après révélation chimique avec le révélateur Vanilline-acide sulfurique, a permis de mettre en évidence la présence de fractions non phénoliques. Il s'agirait des terpènes (FA3) avec un rapport frontal de 0.86.

La fraction FA3 détectée dans l'extrait aqueux est caractérisée par une coloration rosâtre, elle correspond probablement aux terpènes.

Les fractions phénoliques révélées par les différents tests CCM regroupent deux classes de composés :

- les flavonoïdes, (FE3 et FE4) de l'extrait éthanolique avec des valeurs de RF de 0.81 et 0.94 et d'une coloration jaune à l'œil nu, s'identifient à la quercétine et à la catechine utilisés comme standards. Ces fractions sont mises en évidences par le test avec le chlorure d'aluminium (coloration jaune a l'œil nu).
- Les acides phénols, présence de différents spots (FA1, FE1 et FE2) avec des valeurs de RF de (0.53, 0.42 et 0.55) et d'une coloration jaunâtre, la fraction FE1 semble correspondre à l'acide ferrulique comme standard et les deux fractions FA1 et FE2 à l'acide coumarique.

Les profils chromatographiques d'élution au système éthyle acétate/ méthanol/ eau des extraits aqueux et éthanolique sont présentés dans la **(Figure 18)**.

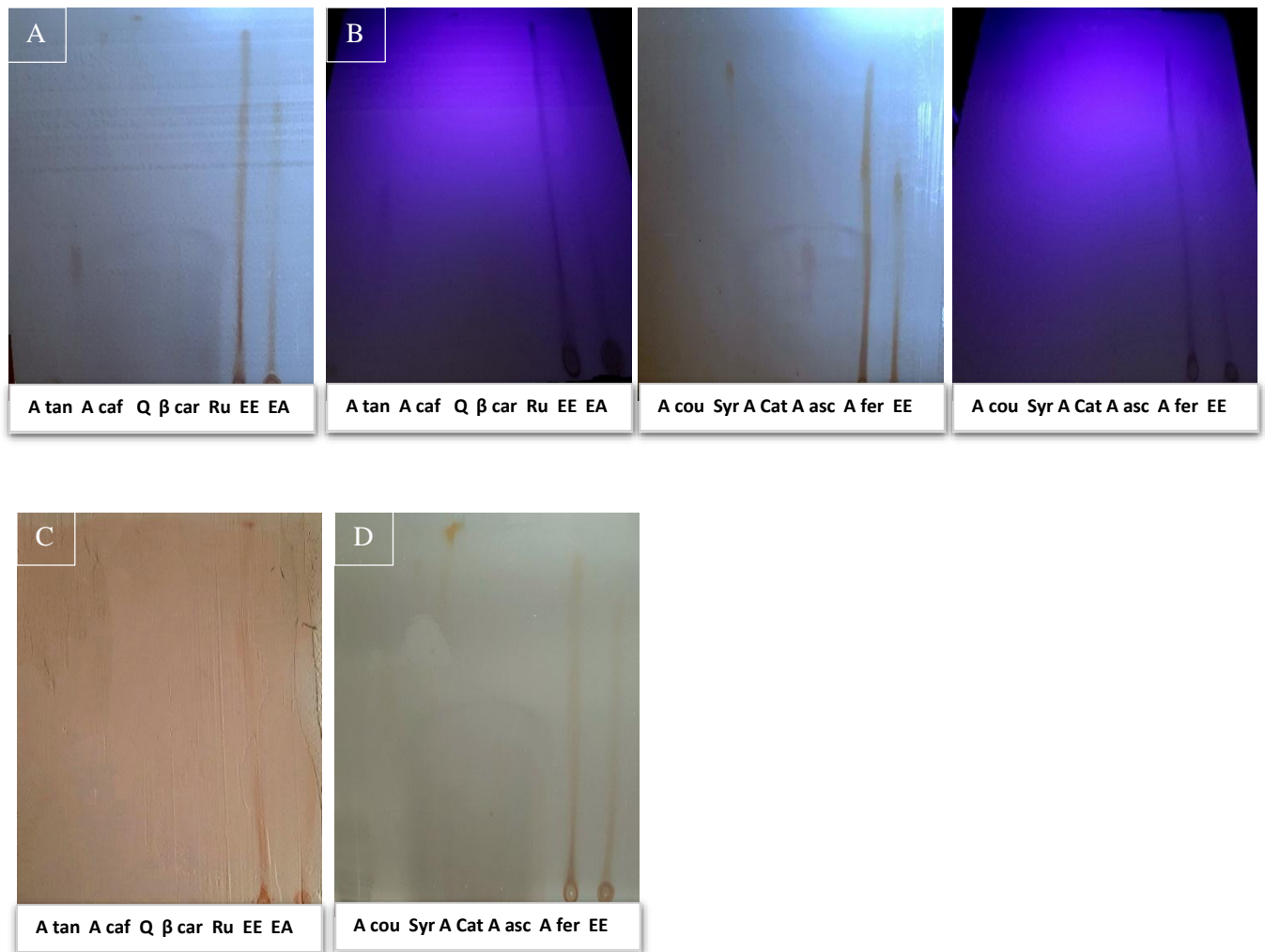


Figure 18: Chromatogrammes des extraits de feuilles de goyave à la lumière du jour (A), sous la lampe UV 365nm (B), après révélation avec la vanilline-acide sulfurique (C) et avec le chlorure d'aluminium (D).

EA : Extrait aqueux; EE : Extrait éthanolique; Ru : rutine; β car : β -carotène; Q : quercétine; A caf : acide caféique; A tan : acide tannique; A fer : acide ferrulique; A asc : acide ascorbique; Cat : catechine; Syr A : syringic acid; A cou : acide coumarique.

II.3.4. Caractérisation dans le système acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau (100 :11 :11 :26)

Les principales caractéristiques (RF et coloration) des standards utilisés sont résumées dans le tableau X. Nous notons une variabilité de la valeur du RF (0.61 à 0.97) et de la couleur des spots obtenus.

Tableau X : Résultats de la chromatographie sur couche mince des standards utilisés sur gel de silice, d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau.

Standard	RF	Couleur a l'œil nu	Couleur sous UV
Rutine	0.61	Brune	Mauve
B-carotène	0.97	Orange	Violet
Quercétine	0.91	Jaune verdâtre	Mauve foncé
Acide caféique	0.91	Jaune verdâtre	Fluorescent
Acide tannique	0.80	Gris	Mauve
Acide ferrulique	0.93	Rose clair	Fluorescent
Catechine	0.94	Jaune clair	Mauve

L'élution des plaques par le système acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau met en évidence 13 fractions inégalement réparties entre les deux extraits notées FA1 à FA5 pour l'extrait aqueux et FE1 à FE8 pour l'extrait éthanolique selon la valeur du RF et la coloration (Tableau XI).

Tableau XI : Résultats de fractionnement des extraits des feuilles de *Psidium guajava* dans le système d'élution : acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau.

	RF	Œil nu	Sous UV	Vanilline-H ₂ SO ₄	AlCl ₃	FeCl ₃	Liebermann Burchard	KOH	EA	EE	Composé probable
FA1	0.14	Brun	Mauve	Brun rosé	Brun	Invisible			+	+	Terpène
FA2	0.31	Jaune brun	Mauve foncé	Invisible	jaune	Gris		Rose clair	+	+	Tanin
FA3	0.73	Jaune verdâtre	Mauve	Invisible	Brun foncé	Invisible	Mauve clair		+	+	Triterpène
FA4	0.82	Jaune verdâtre	Mauve	Invisible	Brun foncé	Gris			+	+	Acide tannique
FA5	0.92	Jaune	Brun		Jaune	Invisible		Beige	+	+	Catéchine
FE1	0.14	Brun	Mauve	Brun rosé	Brun	Gris foncé			+	+	Terpène
FE2	0.31	Brun	Mauve	Invisible	brun	Gris		Rose	+	+	Tanin
FE3	0.73	Jaune	Mauve	Invisible	Brun	Invisible	Mauve clair		+	+	Triterpène
FE4	0.82	Jaune verdâtre	Mauve	Invisible	Brun foncé	Gris			+	+	Acide tannique
FE5	0.92	Jaune	Mauve	Invisible	Jaune	Gris foncé		Orange	-	+	Catéchine
FE6	0.94	Brun	Mauve	Invisible	Jaune	Invisible			-	+	Quercétine
FE7	0.96	brun	Invisible	Brun		Invisible		Orange	-	+	Non identifié
FE8	0.97	Verdâtre	Mauve	Brun	Orange	Invisible			-	+	Caroténoïde

+ : présence ; - : absence

EA : extrait aqueux ; EE : extrait éthanolique.

Les fractions de l'extrait aqueux notés (FA1, FA2, FA3, FA4, FA5) semblent être identiques (RF identiques) aux fractions de l'extrait éthanolique (FE1, FE2, FE3, FE4, FE5) respectivement.

On note la présence d'autres fractions uniquement dans l'extrait éthanolique (FE6, FE7 et FE8) caractérisées par des valeurs de RF variables (0,94 à 0,97) et des colorations différentes.

Le criblage chimique en CCM a permis de mettre en évidence la présence de fractions non phénoliques révélées par les tests effectués (Vanilline-acide sulfurique, Liebermann et Burchard, KOH). Il s'agirait des terpènes (FA1 et FE1), triterpènes (FA3 et FE3).

Les terpènes révélés dans les deux extraits sont visibles à l'œil nu, ils affichent une coloration rosâtre et ont la même valeur de RF de 0.14.

Les triterpènes sont également révélés dans les deux extraits. Ils affichent une coloration violacée à l'œil nu et se caractérisent par un rapport frontal de 0.73.

Les fractions phénoliques révélées par les différents tests CCM regroupent trois classes de composés phénoliques :

- les flavonoïdes, (FA5, FE5 et FE6) des deux extraits avec un rapport frontale de 0.92 pour les deux fractions identiques (FA5 et FE5) et 0.94 pour la fraction FE6 et d'une coloration jaunâtre à l'œil nu et s'identifie à la catéchine et la quercétine utilisées comme standards. Ces fractions sont mises en évidence par le test avec le chlorure d'aluminium (coloration jaunâtre à l'œil nu).
- les tanins, présence d'un spot dans l'extrait aqueux FA4 identique à celui de l'extrait éthanolique FE4 avec un rapport frontal de 0.82 et d'une coloration jaune verdâtre semble correspondre à l'acide tannique. Cette fraction est mise en évidence par le test du FeCl₃ (coloration grise ou brune à l'œil nu).
- Les caroténoïdes, qui se confirment par la présence d'un spot dans l'extrait éthanolique (FE8), d'une couleur orangâtre et un RF de 0,97 qui semble présenter les mêmes caractéristiques que la β -carotène, donc ce dernier est probablement présent dans l'extrait éthanolique.

Les profils chromatographiques d'élution au système acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ Eau des extraits aqueux et éthanolique sont présentés dans la (**Figure 19**).

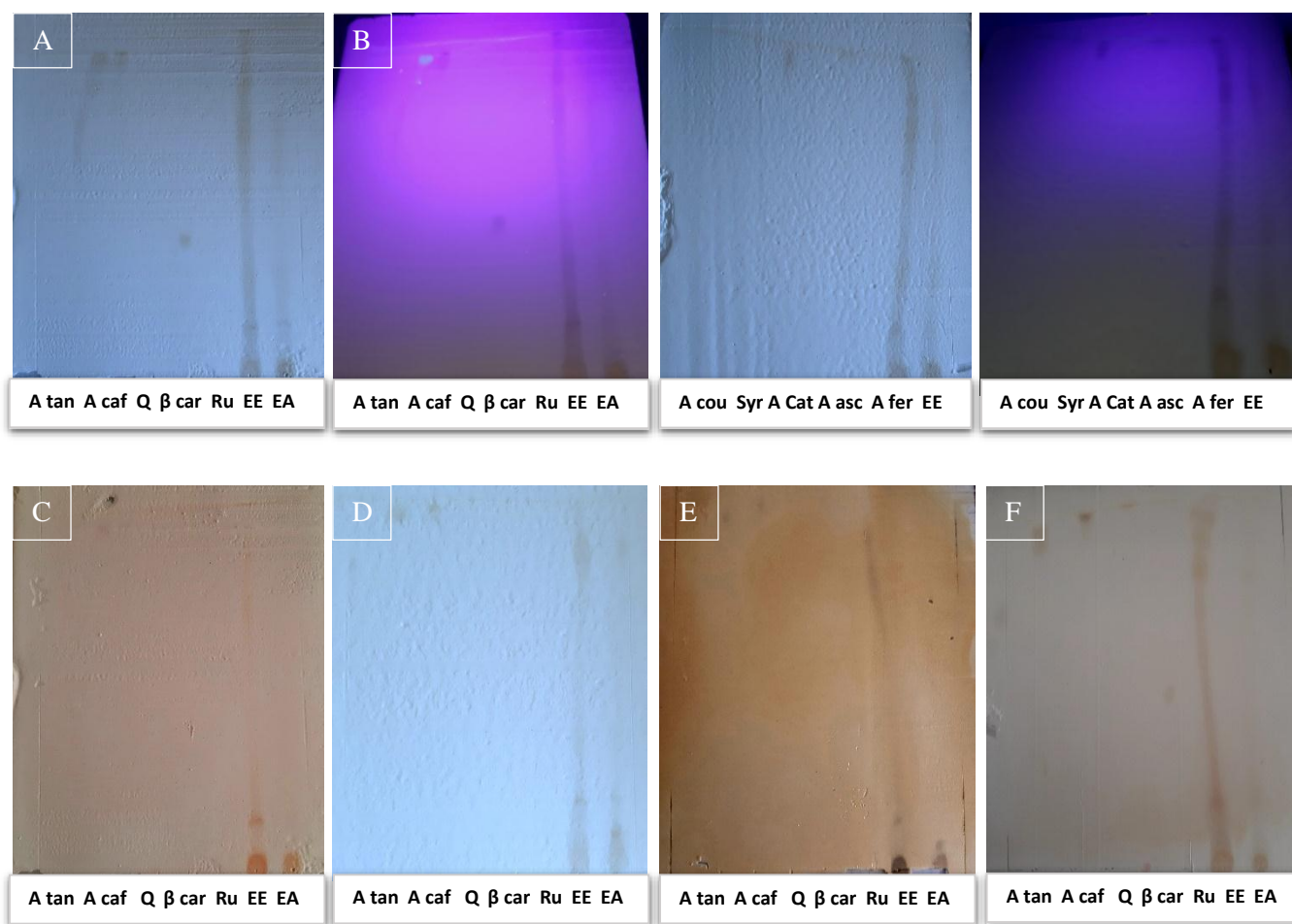


Figure 19 : Chromatogrammes des extraits de feuilles de goyave à la lumière du jour (A), sous la lampe UV 365nm (B), après révélation avec la vanilline-acide sulfurique (C), avec le chlorure d'aluminium (D), avec le chlorure de fer (E), et après révélation avec le KOH.

EA : Extrait aqueux; EE : Extrait éthanolique; Ru : rutine; β car : β -carotène; Q : quercétine; A caf : acide caféique; A tan : acide tannique; A fer : acide ferrulique; A asc : acide ascorbique; Cat : catechine; Syr A : syringic acid; A cou : acide coumarique.

Le système d'élution du chloroforme/ méthanol/ acide acétique et de l'acétate d'éthyle/ Acide formique/ Acide acétique/ Eau) ont permis de mettre en évidence des profils chromatographiques dans lesquels des fractions ont été bien mieux séparées que dans les deux autres systèmes (toluène/éthyle acétate/méthanol et l'éthyle acétate/ Méthanol/ Eau), tandis que pour le système (Ether de pétrole/ éthyle acétate) aucun profil chromatographique n'a été observé. Cette différence repose sur la diversité des mélanges de solvants utilisés et dans la capacité de chaque solvant d'élution à dissoudre ou à désorber les substances à séparer. Les systèmes de solvants vont des solvants non polaires aux solvants polaires, des solvants apolaires sont généralement utilisés, car les solvants hautement polaires provoquent l'adsorption de tout composant du mélange de solvants (Archana et Anubha 2010).

D'une part, les principaux composés phénoliques révélés dans les deux extraits étudiés sont les flavonoïdes, les tanins, les acides phénols et les caroténoïdes qui s'identifient aux composés phénoliques standards utilisés (la catéchine, la quercétine, la rutine, l'acide tannique, la β -carotène, l'acide ferrulique, l'acide caféique et l'acide coumarique). Et d'autre part les composés non phénoliques mis en évidence par des réactifs chimiques qui sont les stérols, les terpènes, les triterpènes et les coumarines.

L'identification d'acides phénoliques dans les extraits de feuilles de goyave s'accorde avec les données de (Gutiérrez et al., 2008 ; Mittal et al., 2010 et Kumar et al., 2021) pour des extraits aqueux, éthanolique à 75% et méthanolique. Les standards n'ont pas tous été identifiés dans les deux extraits, ce qui suggère une variabilité aussi bien qualitative que quantitative des molécules des extraits qui se diffèrent par leur solubilité et leur structure chimique.

II.4. Test du pouvoir anti-radicalaire du DPPH sur plaque CCM

La pulvérisation des plaques CCM éluées au (chloroforme/ méthanol/ acide acétique (5%), éthyle acétate/ méthanol/ eau et à l'acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau) par une solution méthanolique de DPPH à 0,2 % montre une activité antioxydante des différents composants des deux extraits testés. On note l'apparition d'un mélange de spots jaunes (standards) et de bandelettes jaunâtres pour les deux extraits (éthanolique et aqueux) (Figure 20, 21, 22).

L'activité antioxydante par piégeage de radicaux libres peut être due aux composés phénoliques, aux coumarines ou aux substances terpéniques (**Kabran, 2011**). Les résultats montrent la présence de molécules antioxydantes pour chaque extrait avec des intensités différentes, la plus importante activité anti-radicalaire étant observée dans l'extrait éthanolique.

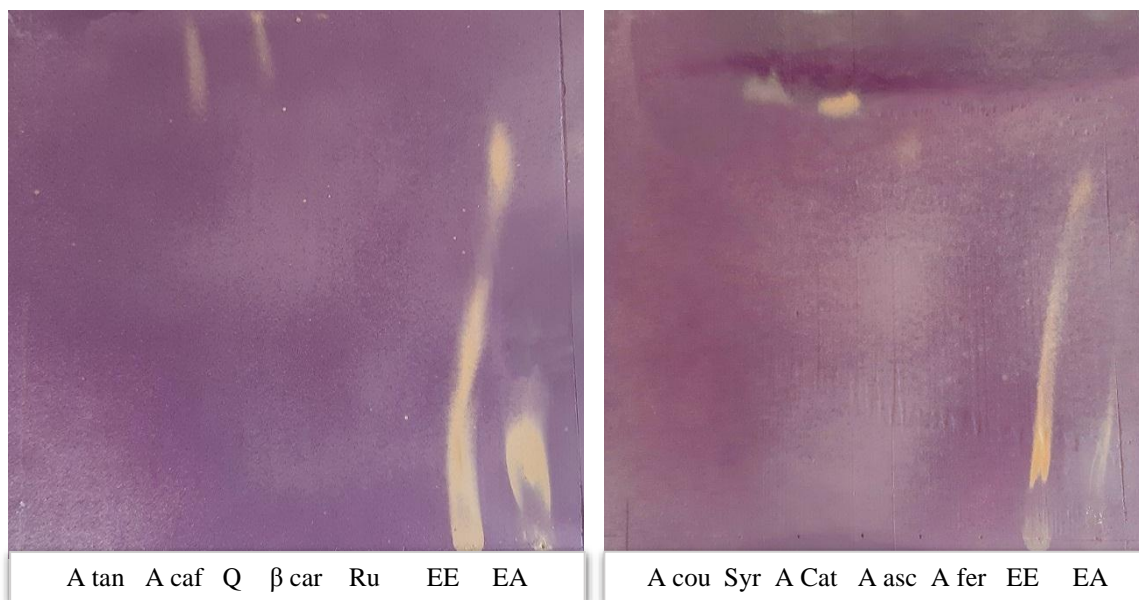


Figure 20 : Test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM dans le système d'éluant (chloroforme/ méthanol/ acide acétique 5%).

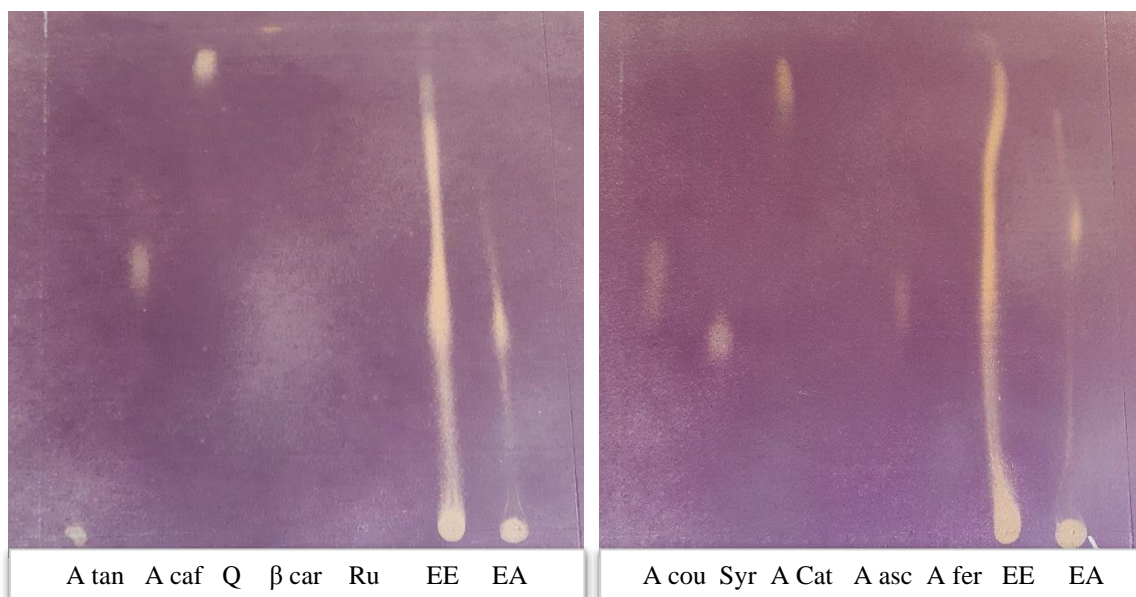


Figure 21 : Test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM dans le système d'éluant (éthyle acétate/ méthanol/ eau).

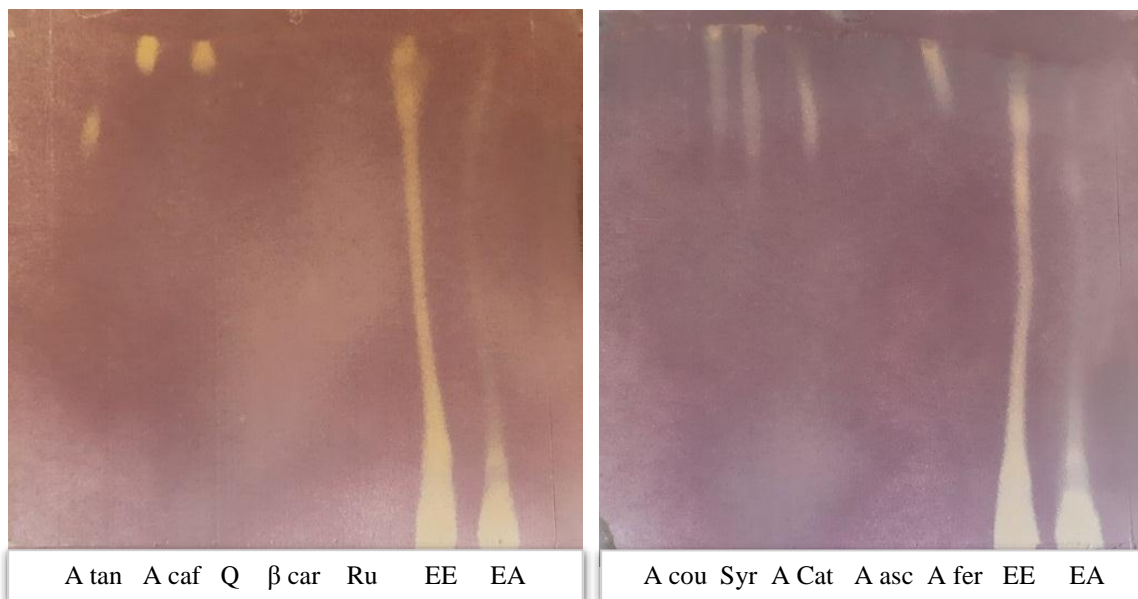


Figure 22 : Test de l'activité anti-radicalaire au DPPH sur plaque CCM dans le système d'éluant (acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau).

EA : Extrait aqueux; EE : Extrait éthanolique; Ru : rutine; β car : β-carotène; Q : quercétine; A caf : acide caféique; A tan : acide tannique; A fer : acide ferrulique; A asc : acide ascorbique; Cat : catechine; Syr A : syringic acid; A cou : acide coumarique.

Conclusion et perspectives

Psidium guajava dite communément le goyavier dont le fruit est la goyave est l'une des espèces les plus exploitées en région tropicale. Etant mal connu en Algérie, *P guajava* mérite une attention particulière vu son utilisation en médecine traditionnelle dans les pays tropicaux et subtropicaux. Notre étude sur l'extrait des feuilles du goyavier confirme sa richesse en molécules bioactives.

Les dosages et le fractionnement chromatographique sur couche mince (CCM) ont montré la présence d'une multitude de types de composés phénoliques dont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins.

Quantitativement, l'évaluation des teneurs en composés phénoliques de l'extrait aqueux a permis de retenir plus de flavonoïdes (1,08mg EQ/g MS) et de composés phénoliques attachés aux parois (1,54 mg EAG/g MS) que les phénols totaux et les tanins, ce qui est le contraire pour l'extrait éthanolique.

La variabilité du contenu en acides phénoliques, flavonoïdes et tanins des différents extraits dépend aussi bien de leur nature chimique que du solvant d'extraction.

Des mélanges de solvants ont été utilisés pour obtenir une séparation optimale des composés phénoliques contenus dans les deux extraits, le meilleur profil chromatographique obtenu a été observé dans le système d'élution (Acétate d'éthyle/ Acide formique/ Acide acétique/ Eau). En effet il est probable que l'ajout d'une petite quantité seulement d'un solvant polaire peut entraîner une forte augmentation du pouvoir éluant du mélange.

Le fractionnement par CCM a permis de confirmer la présence de phyto-composés réputés comme antioxydants dans les deux extraits. L'identification dans nos extraits de stérols, terpènes, triterpènes, esters, coumarines, tanins, caroténoïdes et de flavonoïdes a été mise en évidence par les différents tests employés.

On note néanmoins que l'extrait éthanolique est plus riche en composés phénoliques que l'extrait aqueux. Cette forte teneur est poursuivie d'une plus grande activité antioxydante de cet extrait enregistrée par le test du DPPH.

En perspectives, il serait intéressant d';

- ✓ Utiliser d'autres systèmes d'éluant pour avoir une fine séparation.
- ✓ Utiliser d'autres révélateurs chimiques pour mettre en évidence les fractions obtenues non identifiées.
- ✓ Identifier les fractions obtenues par CCM par de fines méthodes (HPLC, RMN...).
- ✓ Evaluer l'activité biologique des extraits bruts ainsi que des fractions par le moyen d'autres tests.

Références bibliographiques

« A »

Afroze F, Tanvir H. Proximate analysis, phytochemical screening and antioxidant activity of *Psidium guajava* leaves growing in coastal area of Bangladesh. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2015; 4(4):140-151.

Al-Farsi M, Alasalvar C, Morris A, Baron M, Shahidi F. 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* 2005; 53(19):7592-7599.

Alimi H, Hfaiedh N, Bouoni Z, Sakly M, Rhouma K.B. Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* flowers extract in rats. *Environmental toxicology and pharmacology* 2011; 32(3), 406-416.

Archana A.B et Anubha K. AN OVERVIEW ON THIN LAYER CHROMATOGRAPHY. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2010; Vol. 2(2): 256-267.

Ashraf A, Sarfraz R.A, Rashid M.A, Mahmood A, Shahid M, Noor N. Chemical composition, antioxidant, antitumor, anticancer and cytotoxic effects of *Psidium guajava* leaf extracts. *Pharmaceutical biology* 2016; 54(10), 1971-1981.

« B »

Benzie I.F. Vitamin C: prospective functional markers for defining optimal nutritional status. *Proceedings of the Nutrition Society* 1999; 58(2), 469-476.

Bitencourt T.A, TakahasiKomoto T, Marins M, Fachin A.L. Antifungal activity of flavonoids and modulation of expression of genes of fatty acid synthesis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Proceedings. Biology Medical Central* 2014; 8(4), 53.

Boizot N et Charpentier J-P. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA* 2006; 79-82.

Bourdelles J. et P Estanove. La goyave aux Antilles. *Fruits* 1967; vol. 22, p. 397 à 412.

Bourgeois P, Aurore G S, Abaul J, Joseph H. Valorisation de la graine de goyave: huile de l'amande et poudre abrasive des coques. *Cahiers Agricultures* 1998; 7(2), 105-109.

« C »

Chen H-C, Sheu M-J, Lin L-Y, Wu C-M. Nutritional composition and volatile compounds in guava. *Global Science Books* 2007; 1(2), 132-139.

Chiaburu V et Ciobanu E. VITAMINE C – MIRACLES INCONNUS. *Modern Technologies, in the Food Industry* 2018; page 343.

« D »

Dakappa S.S, R. Adhikari S.S, Timilsina S et Sajjekhan S. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae). Journal of Drug Delivery and therapeutics 2013; 3(2), 162-168.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P et Vidal N. Antioxidant Activity of Some Algerian Medicinal Plants Extracts Containing Phenolic Compounds. Food Chemistry 2006; 97, 654-660.

« E »

Elias L.G, Fernandez D.G, Bressani R. Possible effects of seed coat polyphenols on the nutritional quality of bean protein. Journal of Food Science 1979; 44(2), 524-527.

« F »

Ferrari J. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. ex A.Rich. Thèse de Doctorat en Sciences de l'Université de Lausanne 2002; 228 p.

Flores G, Dastmalchi K, Wu S-B, Whalen K, Dabo A J, Reynertson K.A, Foronjy R.F, D'Armiento J.M, Kennelly E.J. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. Food Chemistry 2013 ; 141 : 889–895.

« G »

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

Giuliano G, Bartley G.E, Scolnik P.A. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. The Plant Cell 1993; 5(4): 379-387.

Gossell-Williams M, Simon O.R, West M.E. The Past and Present Use of Plants for Medicines. West Indian Med J 2006; 55 (4): 217.

GUILLOUTY A. Plantes médicinales et antioxydants. Thèse doctorat en pharmacie .Université Toulouse III Sabatier, faculté des sciences pharmaceutiques 2016; p53.

Gülcin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of toxicology 2012; 86(3): 345-391.

Gutiérrez R. M. P, Mitchell S et Solis R. V. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology* 2008; 117(1), 1-27.

« J »

Joseph B et Priya R.M. Phytochemical and Biopharmaceutical Aspects of *Psidium guajava* (L.) Essential Oil: A Review. *Research Journal of Medicinal Plants* 2011, 5: 432-442.

« K »

Kabran G.R, Ambeu N.C, Mamyrbékova-Békro J.A, Békro Y-A. CCM d'extraits sélectifs de 10 plantes utilisées dans le traitement du cancer du sein en Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research* 2011; 63 (4): 592-603.

Kaneria M et Chanda S. Phytochemical and Pharmacognostic Evaluation of Leaves of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). *Pharmacog* 2011; 3(23): 41-45.

Khadhri A, El Mokni R, Almeida C, Nogueira J.M.F, Araújo M.E.M. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia, *Industrial Crops and Products* 2014; 52: 29-31.

Koleckar V, Kubikova K, Rehakova Z, Kuca K, Jun D, Jahodar L, Opletal L. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2008; 8(5): 436-447.

Krief S. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Doctoral dissertation, *Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS* 2003.

Krishnaveni M, Amsavalli L, Chandrasekar R, Durairaj S, Madhaiyan P. Biochemical changes in medicinal plant leaves as a biomarker of pollution. *Research journal of pharmacy and technology* 2013; 6(5): 537-543.

Kumar M, Tomar M, Amarowicz R, Saurabh V, Nair M.S, Maheshwari C, Sasi M, Prajapati U, Hasan M, Singh S, Changan S, Prajapat R.K, Mukesh K.B, et Satankar V. Guava (*Psidium guajava* L.) Leaves: Nutritional Composition, Phytochemical Profile, and Health-Promoting Bioactivities. *Foods* 2021; 10(4): 752.

« L »

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

Lima G.P.P, Vianello F, Corrêa C.R, Campos R.A.d S, Borguini M.G. Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. Food and Nutrition sciences 2014; 1065-1082.

« **M** »

Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.*). Nature & Technologie 2013; 5(2), 35-40.

Maiga M.A.A. Etude de la chimie et des activités biologiques de six (6) plantes dans le traitement traditionnel du diabète: *Allium cepa*; *Allium sativum*; *Daucus carota*; *Eucalyptus globulus*; *Psidium guajava* et *Solanum melongena* 2014.

Mailoa M.N, Mahendradatta M, Laga A, Djide N. Tannin extract of guava leaves (*Psidium guajava L*) variation with concentration organic solvents. International Journal of Scientific and Technology Research 2013; 2(9), 106-110.

Malešev D et Kuntić V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. Journal of the Serbian chemical Society 2007; 72(10): 921-939.

Ministre de santé du Congo PHARMACOPEE TRADITIONELLE DE LA REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO, Science et Tradition 2009. Première édition.

Mittal P, Gupta V, Kaur G, Garg A.K, Singh A. Phytochemistry and pharmacological activities of *Psidium Guajava*: a review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2010; Vol. 1 (9): 9-19.

Morais-Braga M.F.B, Carneiro J.N.P, Machado A.J.T, Dos Santos A.T.L, Sales D.L, Lima L.F, Figueredo F.G, Coutinho H.D.M. *Psidium guajava L.*, from ethnobiology to scientific evaluation: Elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. Journal of Ethnopharmacology 2016; 194: 1140-1152.

« **N** »

Nwozo S.O, Awe S, Oyinloye B.E. In vitro antioxidant activity of extracts from leaves of ten commonly used medicinal plants—a comparative study. Oxid Antioxid Med Sci 2014; 3(3): 211-215.

« **O** »

Offor C.E. Phytochemical and proximate analyses of *Psidium guajava* leaves. Journal of Research in Pharmaceutical Science 2015; 2(6): 05-07.

Okunrobo L.O, Imafidon K.E, Alabi A.A. Phytochemical, proximate and metal content analysis of the leaves of *Psidium guajava* Linn (Myrtaceae). International Journal of Health Research 2010; 3(4): 217-221.

Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A.J. *Psidium Guajava*. Agroforestry Database: A Tree Reference and Selection Guide Version 4.0. World Agroforestry Center, Kenya 2009; 1-5.

« P »

Pontikis C.A. *Psidium guajava* L. (Guava). In: Bajaj, Y.P.S. (eds) Trees IV. Biotechnology in Agriculture and Forestry 1996; 35: 308-320.

POPENOE W. Fruits of the Myrtle family. In: Manual of tropical and subtropical fruits, excluding the banana, coconut, pineapple, citrus fruits, olive and fig. Originally published in 1920 by Macmillan Publishing Co, New York 1974.

Prabhudesai A.P, Dinesh M, Biyani, Milind J. Umekar .Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 59(1), Article 2019; No. 21, Pages : 125-132.

Prance G.T. FRUITS OF TROPICAL CLIMATES. Fruits of Central and South America. In: Caballero, B. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), Academic Press 2003; 2810-2816.

« Q »

Qian H, Nihorimbere V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. Journal of Zhejiang University SCIENCE, 2004; 5(6):676-683.

« R »

Ramu G, Mohan G.K, Jayaveera K.N, Dhanapal S.P, Senthilkumar G. Preliminary phytochemical and antioxidant study of hydroalcoholic extracts from selected genera of Indian Lamiaceae. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2012 ; 685-688.

Ribereau-Gayon P. Notion générale sur les composés phénoliques. In : « Les composés phénoliques des végétaux ». Ed. Dunod 1968; 1-40.

Rodríguez M.N.N, Herrero J.V-I. Guava (*Psidium guajava* L.) Cultivars. In Nutritional Composition of Fruit Cultivars 2016; Chapter 13 Pages 287-315.

« S »

Sahu M, Pandey S, Bharti S. Tropical Fruit Apple of the Poor's People (*Psidium guajava* L.). Int. J. Life. Sci. Scienti. Res 2016; 2 (5): 548-551.

Salgado H.R.N, Roncari A.F.F, Michelin D.C, Moreira R.R.D. Evaluation of antidiarrhoeal effects of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) aqueous leaf extract in mice. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences 2006; 27(1): 89-92.

Sanda K.A, Grema H.A, Geidam Y.A, Bukar-Kolo Y.M. Pharmacological aspects of *Psidium guajava*: An update. International Journal of Pharmacology 2011; 7(3): 316-324.

Seo J, Lee S, Marcus L Elam, Sarah A Johnson, Kang J, Bahram H. Arjmandi. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. Food Science & Nutrition 2014; 2(2), 174–180.

Srinivasa Rao A, Ahmed M.F. Simultaneous estimation of quercetin and rutin in ethanolic extract of *Melia azedarach*. Linn leaves by HPTLC method. Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences 2013; 3(21), 56-69.

« V »

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

Venkatachalam R.N, Singh K, Marar T. Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of *Psidium guajava*. Free Radicals and Antioxidants 2012; 2(1): 31-36.

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

« W »

Wilson P.G, O'Brien M.M, Gadek P.A, Quinn C.J. Myrtaceae Revisited: A Reassessment of Infraclassical Groups. American Journal of Botany 2001; 88(11): 2013-2025.

^[1] <https://www.djazairess.com>.

Annexes

Annexe1 : Courbes d'étalonnage

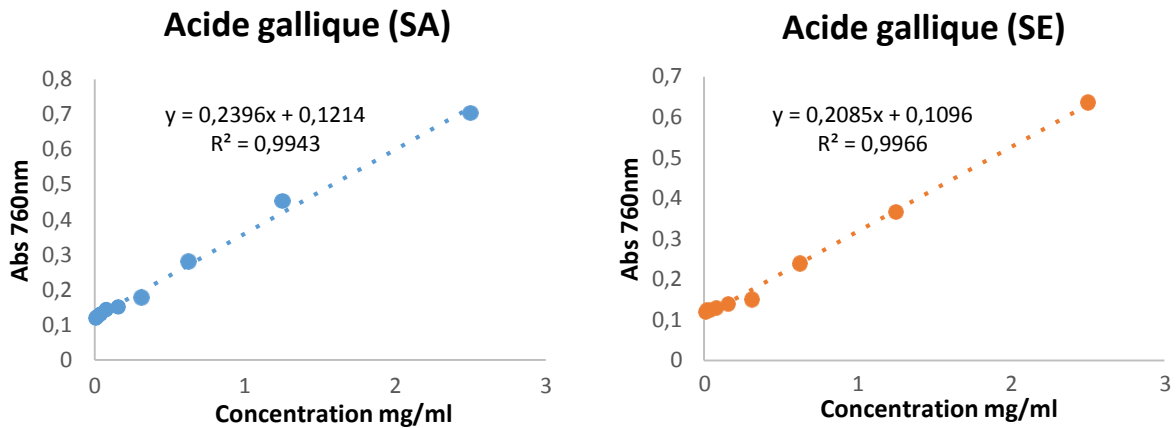


Figure 1 : Dosage des phénols totaux

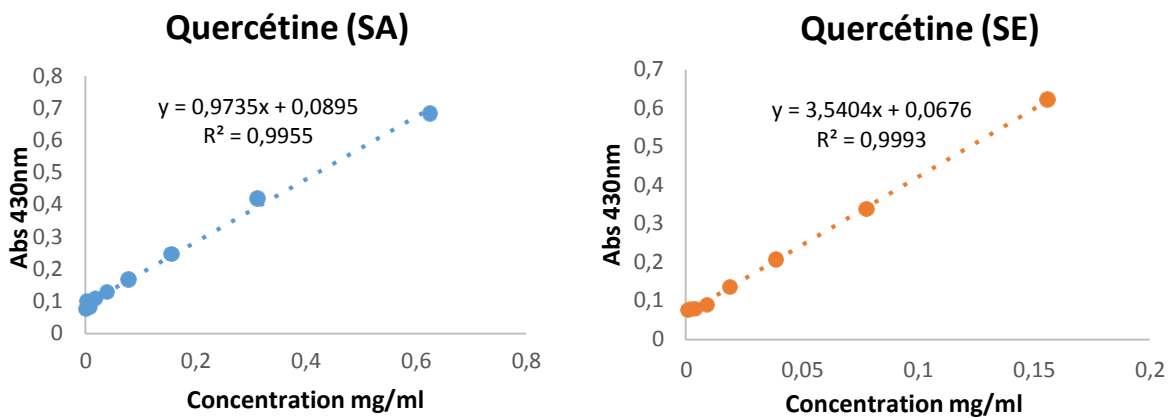


Figure 2 : Dosage des flavonoïdes

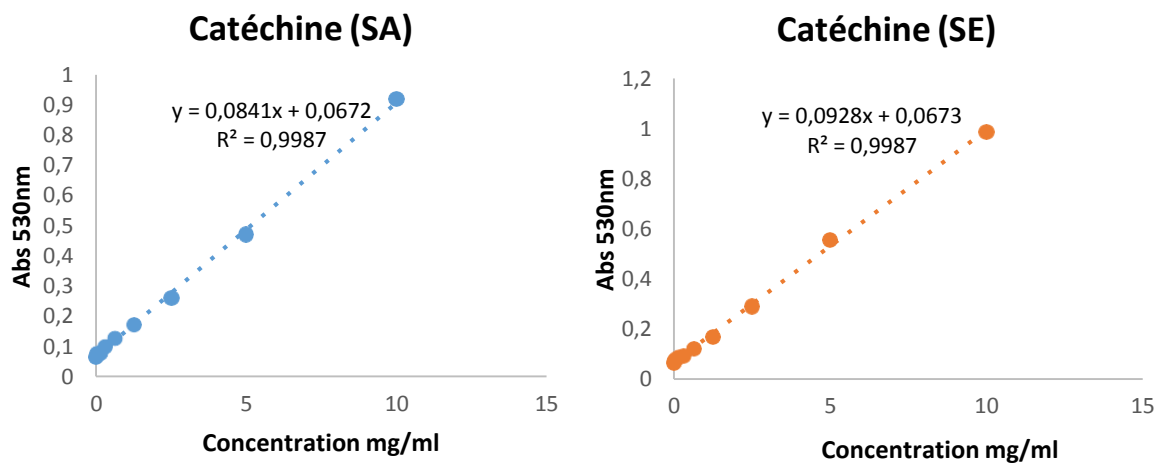
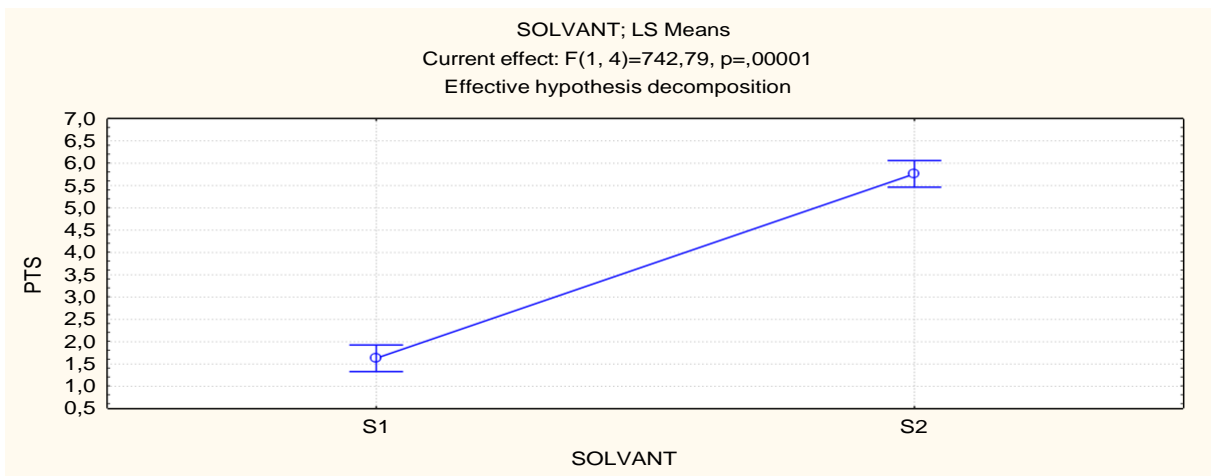


Figure 3 : Dosage des tanins

Annexe 2 : données statistiques

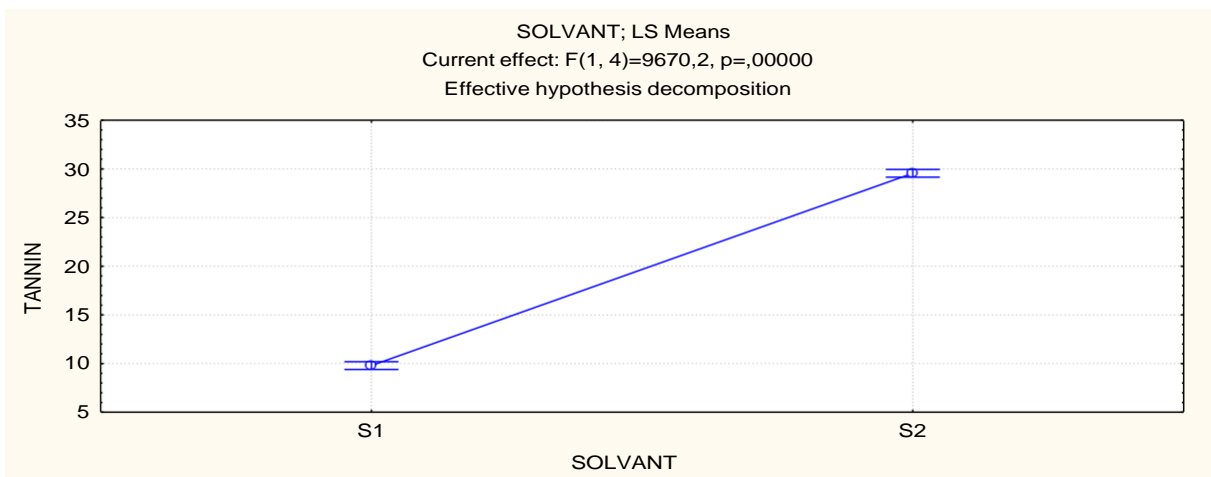
Tests univariés de signification pour les PTS

Effect	SS	Degr. Of freedom	MS	F	P
Intercept	81.89451	1	81.89451	2377.092	,000001
Solvant	25,59031	1	25,59031	742,794	,000011
Error	,13781	4	,03445		



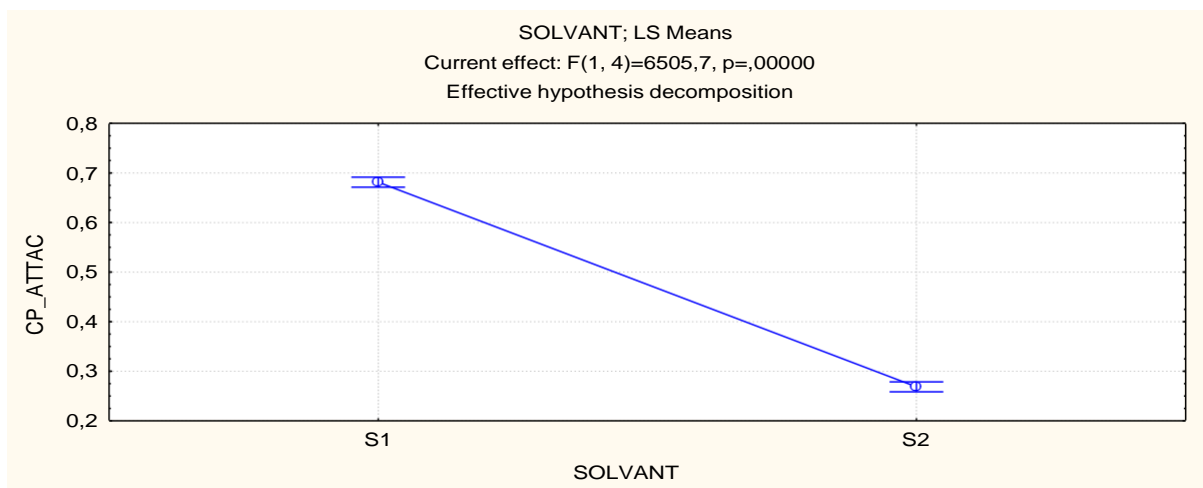
Tests univariés de signification pour les tanins

Effect	SS	Degr. Of freedom	MS	F	P
Intercept	2322,188	1	2322,188	38357,55	,000000
Solvant	585,437	1	585,437	9670,16	,000000
Error	,242	4	,061		



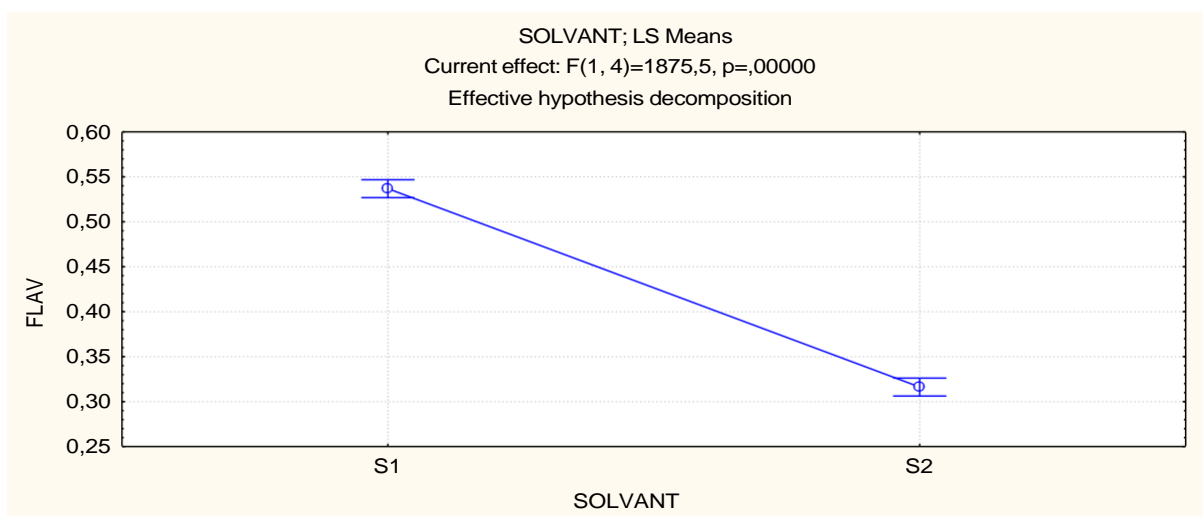
Tests univariés de signification pour les CP attachés à la paroi

Effect	SS	Degr. Of freedom	MS	F	P
Intercept	1,353658	1	1,353658	34454,08	,000000
Solvant	,255603	1	,255603	6505,74	,000000
Error	,000157	4	,000039		



Tests univariés de signification pour les flavonoïdes

Effect	SS	Degr. Of freedom	MS	F	P
Intercept	1,091412	1	1,091412	28032,31	,000000
Solvant	,073021	1	,073021	1875,51	,000002
Error	,000156	4	,000039		



Annexe 3 : solution et réactifs

Tableau : préparation des solutions

Solution	Réactifs
Éthanol 45%	45 ml d'éthanol + 55ml d'eau distillée.
NaOH (1N)	4g de soude (NaOH) +100ml d'eau distillée.
Na ₂ CO ₃ (2%)	2g de Na ₂ CO ₃ + 100ml d'eau distillée.
Folin-Ciocalteu 50/50	1ml de folin-Ciocalteu + 1ml d'eau distillée.
AlCl ₃ (2%)	2g d'AlCl ₃ + 100 ml d'eau distillée.
Solution de sulfate de fer butanol-HCl	(3/2) butanol-HCl + (30mg/200ml) sulfate de fer (sous l'hôte).
Vanilline-Acide sulfurique (H ₂ SO ₄)	1g de vanilline + 2ml d'acide sulfurique (H ₂ SO ₄) + 100ml de méthanol.
Chlorure ferrique (FeCl ₃) à 2%	2g de FeCl ₃ +100ml de méthanol.
Chlorure d'aluminium (AlCl ₃) à 1%	1g + 100ml + 100ml de méthanol.
Réactif de Liebermann et Burchard	5ml d'acétique anhydride + 5ml d'acide sulfurique concentré + 50ml d'éthanol pur (Préparé à basse température et juste avant utilisation).
Solution DPPH à 0.2%	0.2g + 100ml de méthanol
KOH méthanolique à 5%	5g de KOH + 100ml de méthanol

Résumé

De nombreux pays utilisent depuis longtemps la goyave à des fins médicinales. Cette plante trouve des applications pour le traitement de nombreuses maladies. Le but de ce travail est d'évaluer d'une part la teneur en composés phénolique des extraits aqueux et éthanolique des feuilles de cette plante, et d'autre part, d'optimiser les conditions de leur séparation sur CCM en testant différents systèmes d'élution, et d'évaluer leur activité antioxydante. Les résultats montrent une richesse de l'extrait éthanolique en polyphénols, avec des teneurs plus élevées en phénols totaux et tanins condensés, contrairement à l'extrait aqueux avec des teneurs élevées en flavonoïdes et en composés phénoliques attachés aux parois, la variabilité du contenu en composés phénoliques dépend aussi bien de leur nature chimique que du solvant d'extraction. Le criblage phytochimique sur plaque CCM a permis d'obtenir une séparation optimale des composés phénoliques dans le système d'élution composé d'acétate d'éthyle/ acide formique/ acide acétique/ eau, et à confirmer la présence des acides phénoliques, flavonoïdes et tannins, réputés antioxydants dans les deux extraits. Il a néanmoins été noté que l'extrait éthanolique est plus riche en composés phénoliques que l'extrait aqueux. La présence de ces derniers justifie l'activité antioxydante enregistrée par le test du DPPH et l'utilisation des feuilles du goyavier dans le traitement de différentes maladies.

Mots clés : *Psidium guajava*, composés phénoliques, CCM, extrait éthanolique 45%, activité antioxydante, solvants.

Abstract

Many countries have long used guava for medicinal purposes. This plant finds applications for the treatment of many diseases. The aim of this work is to evaluate on the one hand the content of phenolic compounds of the aqueous and ethanolic extracts of the leaves of this plant, and on the other hand, to optimize the conditions of their separation on TLC by testing different systems of elution, and to evaluate their antioxidant activity. The results show a richness of the ethanolic extract in polyphenols, with higher contents of total phenols and condensed tannins, contrary to the aqueous extract with high contents of flavonoids and phenolic compounds attached to the walls, the variability of the content in phenolic compounds depends both on their chemical nature and on the extraction solvent. The phytochemical screening on TLC plate made it possible to obtain an optimal separation of the phenolic compounds in the elution system composed of ethyl acetate/formic acid/acetic acid/water, and to confirm the presence of phenolic acids, flavonoids and tannins, reputed antioxidants in both extracts. It has nevertheless been noted that the ethanolic extract is richer in phenolic compounds than the aqueous extract. The presence of these justifies the antioxidant activity recorded by the DPPH test and the use of guava leaves in the treatment of various diseases.

Key words : *Psidium guajava*, phenolic compounds, CCM, 45% ethanolic extract, antioxidant activity, solvents.