

Réf :

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

MASTER

Thème

**Optimisation d'extraction des
composés phénoliques du goyavier**

Présenté par :

Milles ABBACI Wissam et ABBOU Lynda

Soutenu le: 01 juillet 2024

Devant le jury composé de :

Mme BECHEUR Nacera	MCA	Président
Mme AOUDIA Hassiba	MCB	Encadrant
Mme KOUACHI Kahina	Professeur	Co-encadrant
Mr OUCHEMOUKH Salim	Professeur	Examineur

Année universitaire : 2023 / 2024

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre profonde gratitude à Dieu, dont les bénédictions et la sagesse ont été essentielles dans notre parcours pour mener à bien ce projet. Sa grâce nous a donné la force, la persévérance et la clarté d'esprit tout au long de cette entreprise.

Nous remercions chaleureusement notre encadrante Mme AOUDIA.H et Co-encadrante Mme KOUACH.K, pour leur soutien inestimable, leur mentorat et leurs encouragements tout au long du développement de ce projet. Leur expertise et dévotion qui a été cruciale pour façonner ce travail et nous guider vers l'excellence académique.

Nous souhaitons également exprimer notre sincère gratitude à Mr OUCHEMOUKH.S et Mme BECHEUR.N pour avoir accepté gracieusement d'évaluer notre travail. Votre volonté de consacrer votre temps et votre expertise à la revue de notre recherche est profondément appréciée. Vos commentaires pertinents et vos critiques constructives contribueront sans aucun doute à l'amélioration de notre travail. Merci pour vos contributions précieuses et pour avoir été partie prenante de ce voyage académique si important.

De plus, nous tenons à exprimer notre reconnaissance à notre famille, nos amis et nos collègues pour leur soutien indéfectible, leur compréhension et leurs encouragements tout au long de ce projet exigeant mais enrichissant.

Notre profonde gratitude

DEDICACES

*Je dédie ce modeste travail, avec tout mon respect, amour et honneur, à toutes les personnes qui me sont chères. À ma famille bien-aimée, et à la source de ma vie, A ma tendre **mère** et mon très cher **père**.*

*A la mémoire de **mon grand frère Mohamed**, que dieu l'accueille à son vaste paradis.*

*A la lumière de ma vie **mon petit frère Abdelhakadorée**, que dieux le protège.*

*A **ma grande mère paternelle**, Que Dieu l'accorde santé, bonheur et longue vie.*

A mes tantes et cousines

*A mes amis **Lydia, Chafika, Meriem, Mohamed**.*

*A ma collègue **Wissam** que je remercie dieu qui nous a fait rencontrer depuis ma première année universitaire à laquelle je souhaite une longue vie pleine de*

bonheur et de succès. Merci pour ton grand cœur et ton soutien.

Lynda

DEDICACES

*Je dédie ce modeste travail avec tout mon respect, amour et honneur à toutes les personnes qui me sont chers. A mon adorable famille, à ma source de vie mes chers **papa** et **Mama**, mon exemple et ma motivation ma grande sœur **Mélissa** et à ma source de joie mes petits frères **Adem** et **Thiziri** et à **YAYA Fatima** et **JEDDI Madjid**. Que Dieu vous accorde santé, bonheur et longue vie.*

*Je ne pourrai jamais exprimer ma profonde gratitude à toutes les bonnes âmes, mes amis : **Mininouh** , **Sarah** , **Kenza** , **Yanis** , **Lydia** , **Selma** et **Roza** , **Massi** et **Islam** , **Samir** et **Souha** pour toutes les aventures les folies , énergie positive et merveilleux souvenirs aux quels on s'est sentis rois et reines de notre monde.*

*A ma mignonne collègue de travail **Lynda**, je te remercie d'avoir rendu mes cinq années à l'université et ce travail agréable.*

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

WISSAM

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	
Introduction	1
I.1. Généralités sur la goyave	3
I.1.1. Origine et répartition géographique	3
I.1.2. Nomenclature	4
I.1.3. Description botanique	4
I.1.4. Taxonomie	5
I.1.5. Variétés	6
I.1.6. Climat et sol	6
I.1.7. Production mondiale	6
I.1.8. Goyavier en Algérie	7
I.1.10. Utilisation du Goyavier	7
I.1.10.1. Utilisation traditionnelle.....	7
I.1.10.2. Effets biologiques de la goyave	8
I.2. Généralités sur les composés phénoliques	10
I.2.1. Classification.....	10
I.2.1.1. Acides phénoliques	11
I.2.1.2. Les flavonoïdes	11
I.2.1.2.1. Structure basique des flavonoïdes.....	12
I.2.1.2.2. Importance des flavonoïdes.....	12
I.2.1.3. Les tanins	12
I.2.1.3.1. Classification des tanins.....	13
I.3. Méthodes d'extraction.....	14
I.3.1. Méthodes d'extraction conventionnelles.....	14
I.3.1.1. Extraction par macération	14
I.3.2. Méthodes d'extraction non conventionnelles.....	14
I.3.2.1. Extraction assistée par ultrasons	15
I.1. Choix de la matrice végétale	16
I.2. Echantillonnage.....	16
I.3. Méthodologie	16
I.3.1. Préparation des échantillons.....	16
I.4. Méthodes d'analyses physico-chimiques.....	17
I.4.1. Les rendements en extrait secs	17

I.4.2. Taux d'humidité.....	17
I.4.3. Teneur en sucre (Brix)	17
I.4.4. Mesure du pH.....	18
I.4.5. Mesure de la conductivité	18
I.5. Extraction des composés phénoliques.....	18
I.5.1. Extraction par macération	19
I.5.2. Extraction par ultrason	19
I.6. Modélisation et optimisation du processus d'extraction.....	19
I.6. Dosage des composés phénoliques	21
I.6.1. Réactifs	21
I.6.2. Dosage des composés phénoliques totaux	21
I.6.3. Dosage des flavonoïdes.....	22
I.6.4. Dosage des tanins condensés	22
I.7. Evaluation de l'activité antioxydant par piégeage du radical libre DPPH.....	23
I.8. Analyses statistiques	24
II.1. Optimisation d'extraction des composés phénoliques à partir de la poudre de feuille de <i>Psidium guajava</i> L.....	25
II.1.1. Ajustement des moindres carrés	25
II.1.2. Profileur de prévision	26
II.2. Caractérisation physico-chimique	27
II.3 Les rendements en extrait secs.....	28
II.4. Teneur en composés phénoliques et activité antioxydant.....	29
II.3.1. Teneur en composés phénolique totaux.....	29
II.4. Teneur en flavonoïdes.....	30
II.5. Teneur en tanins condensés	31
II.3.2. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH	32
Conclusion et perspectives	35
Références bibliographiques	37

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

ABTs : 2,2'-azino-bis (3 éthylbenzo thiazoline-6-sulphonique).

AG:Acide gallique.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

Anova : Analysis of variance(l'analyse de la variance)

CI₅₀ : Concentration d'inhibition à 50%.

CPT: Composés phénolique totaux.

DPPH:1,1 diphényl 1-2 picrylhydrazyl.

EAG : Equivalent acide gallique.

EC : Equivalent catéchine.

EQ : Equivalent quercétine.

ET : Equivalent trolox.

FRAP : Pouvoir antioxydant réducteur du Fer.

H : humidité (%).

HCL : Acide chlorhydrique.

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

JMP: Jonh'sMacintosh Project.

MAC : Macération.

MS : Matière sèche.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

R : Rendement (%).

RSM : Méthode de la surface de réponse.

TEAC : Capacité antioxydants équivalent au Trolox.

US : Ultrason.

Liste des figures

Figure 01 : Répartition mondiale de la goyave dans le monde (bleu : régions originaires ; vert : régions non originaires).

Figure 02 : Description du goyavier : arbre (1) ; feuilles (2) ; fleurs (3) ; fruits (4).

Figure 03 : Principales utilisations traditionnelles des feuilles de la Goyave dans les pays Producteurs.

Figure 04 : Schéma explicatif des classes et sous classes des polyphénols.

Figure 05 : Structure basique des flavonoïdes (a);structure commune d'un flavonoïde (b).

Figure 06 : Classification des tanins.

Figure 07 : Feuilles et poudre de *Psidium guajava*.

Figure 08 : La structure chimique du radical libre DPPH (couleur violet) et sa forme réduite (couleur jaune).

Figure 09 : La distribution des nuages de points des réponses de la teneur en phénols totaux des deux méthodes d'extraction.

Figure 10 : Profileur résultats de prévision (paramètres optimaux de l'extraction par macération des composés phénoliques).

Figure 11 : profileur Résultats du de prévision (paramètres optimaux de l'extraction par l'ultrason des composés phénoliques).

Figure 12 : La teneur en composés phénolique totaux des extraits obtenus par les deux méthodes.

Figure 13 : La teneur en flavonoïdes des extraits obtenus par les deux méthodes.

Figure 14 : Teneur en tanins condensés obtenus par les deux méthodes.

Figure 15 : Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH obtenus par les deux méthodes.

Figure 16 : Valeurs des CI50 des extraits obtenus par macération et ultrason avec l'acide ascorbique.

Liste des tableaux

Tableau I : Codage des différentes variables pour l'extraction par macération.

Tableau II : Codage des différentes variables pour l'extraction par ultrason.

Tableau III : Résultats d'analyse physico-chimique des extraits de feuilles de goyavier.

Tableau IV : Les résultats du rendement d'extraction des feuilles de *Psidium guajava* L.

Liste des annexes

Annexe 01 : La mesure de Brix de l'extrait avec le refractomètre.

Annexe 02 : La mesure de pH de l'extrait avec le pH-mètre.

Annexe 03 : La mesure de conductivité de l'extrait avec le conductimètre.

Annexe 04 : Les étapes de l'extraction par macération.

Annexe 05 : Les étapes de l'extraction par ultrason.

Annexe 06 : Les principaux réactifs utilisés ainsi que leurs rôles.

Annexe 07 : Les courbes d'étalonnage.

Annexe 08 : Défaut d'ajustement de l'extraction par macération.

Annexe 09 : Défaut d'ajustement de l'extraction par ultrason à différente puissance.

Annexe 10 : Corrélation des composés phénoliques dosés des extraits de feuille de *Psidium guajava* avec le pourcentage d'inhibition du DPPH.

Introduction

Introduction

Depuis toujours, les humains ont fait appel aux remèdes naturels à base de plantes médicinales pour soigner des pathologies, mais avec l'arrivée de la médecine moderne ces remèdes ont été abandonnés et remplacés par des produits synthétiques qui engendrent des effets secondaires plus que les remèdes naturels (**Cushnie et Lamb, 2005**). Les plantes médicinales possèdent des propriétés pharmaceutiques qui les rendent particulièrement utiles en médecine, en synthétisant divers composés appelés métabolites secondaires.

Les polyphénols sont des substances naturelles utilisés à des fins thérapeutiques en tant qu'agents anti-hémolytiques, antioxydants et antibactériens (**Ghedadba et al., 2015**). Des recherches récentes ont souligné l'importance de l'optimisation des méthodes d'extraction afin d'augmenter la récupération des composés phénoliques à partir de matériaux végétaux (**Alara et al., 2021; Stefanos et al., 2022**).

PsidiumGuajava. L'communément appelé goyavier est un arbre fruitier tropical largement cultivé, réputé pour ses divers composés phytochimiques bénéfiques, notamment les composés phénoliques (**Oreopoulou et al., 2019 ; Stefanos et al., 2022**). Les extraits de feuilles de goyave contiennent de nombreux composés phénoliques et d'autres composés chimiques dont il a été démontré qu'ils peuvent être utilisés dans le traitement des maladies infectieuses pour présenter divers effets pharmacologiques, notamment anti-inflammatoires, antimicrobiens et anti-prolifératifs (**Jang et al., 2014**).

L'étape cruciale de l'isolement des composés actifs nécessite l'extraction des molécules bioactives qui peut être réalisée à l'aide de diverses méthodes conventionnelles et non conventionnelles, comme la macération et les ultrasons (**Selvamuthukumar et Shi, 2017 ; Alara et al., 2021**).

Dans ce contexte, notre travail s'oriente vers l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques des feuilles du goyavier afin d'obtenir un extrait riche en ces molécules d'intérêt et dosage de ces composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) ainsi que de l'évaluation *in vitro* de leur activité antioxydante.

Ce document est divisé en trois grands chapitres ;

Introduction

- Le premier est une synthèse bibliographique divisée en trois parties : la première concerne des généralités sur le goyavier ; la deuxième présente quelques généralités sur les composés phénoliques et la troisième partie traite les méthodes d'extraction des composés phénoliques.
- Le deuxième chapitre est le matériel et méthodes utilisés dans nos différentes expérimentations.
- Le troisième chapitre parle des résultats obtenus et de leur discussion.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Partie I :
Généralités sur legoyavier

I.1. Généralités sur la goyave

I.1.1. Origine et répartition géographique

Originnaire des régions tropicales d'Amérique, la goyave est cultivée depuis plus de 2 000 ans en Amérique centrale (Arévalo-Marín *et al.*, 2021). Elle pousse aussi dans les Antilles depuis 1526 et introduite aux Philippines par les Espagnols et en Inde par les Portugais au début du 17^{ème} siècle. Grâce à sa facilité de culture et sa valeur nutritionnelle élevée, combinées à la popularité des produits dérivés, la goyave s'est répandue dans plusieurs pays (Figure 01). De plus, cette espèce joue un rôle important dans les économies nationales et le commerce international. Parmi les plus grands producteurs, on trouve l'Inde, Hawaï, la Floride, l'Afrique du Sud, le Brésil, la République dominicaine, Haïti, Cuba, la Guyane, les Philippines et la Nouvelle-Zélande (Menzel, 2017).

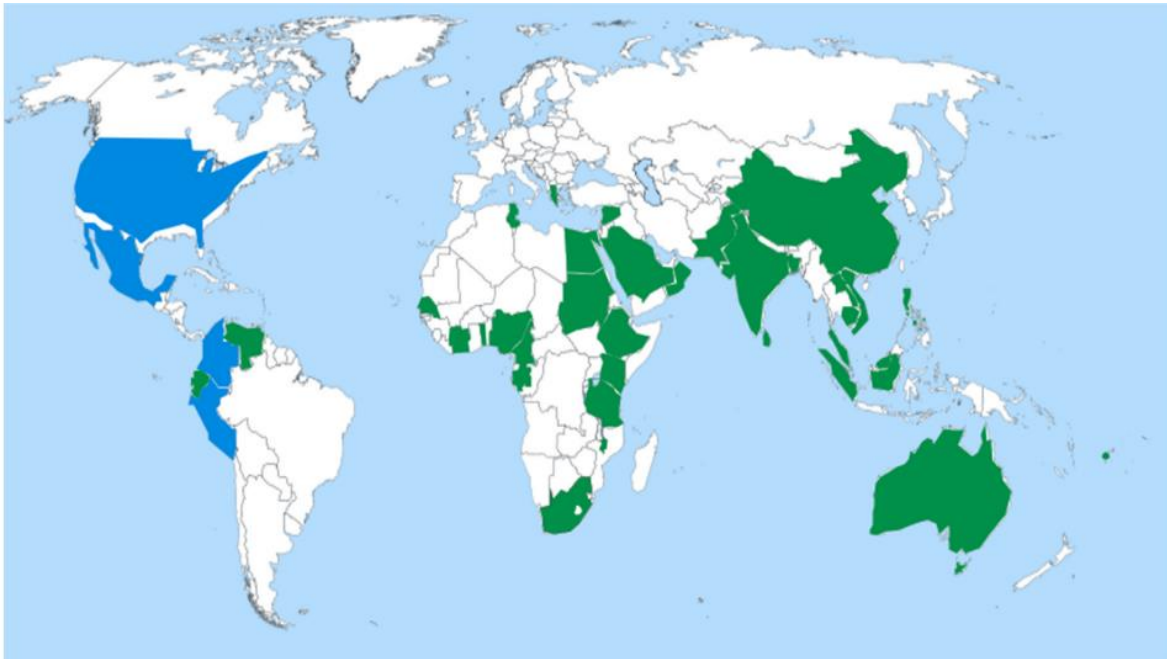


Figure 01 : Distribution mondiale de la goyave dans le monde (bleu : régions originaires ; vert : régions d'introduction (Ugbogu *et al.*, 2022).

I.1.2. Nomenclature

Le goyavier, généralement connu sous l'appellation scientifique *Psidiumguajava*.Lpeut également être identifié par plusieurs synonymes tels : *G. Pumila* (Vahl) Kuntze; *G. pyrifera*(L.) Kuntze; *Myrtusguajava* (L.) Kuntze; *M. guajava* var. *pyrifera* (L.) Kuntze; *Psidiumangustifolium*Lam.; *P. cujavillus*Burm.f.; *P. cujavus* L.; *P. fragrans*Macfad.; *P. guajava* var. *cujavillum* (Burm.f.) Krug & Urb.; *P. guajava* var. *guajava*; *P. guava*Griseb.; *P. igatemyense*Barb.Rodr.; *P. igatemyensis*Barb. Rodr ; *P. pomiferum* L (**The plant list 2013**).D'autre part, la dénomination du goyavier varie d'un pays à un autre. A titre d'exemple, il est communément appelé djawafa en arabe ; goyave/goyavier en français ; guava en anglais ; guave/guavenbaum en allemand ; banjiro en japonais ; goiaba/goiabeiro en portugais etaraçá-goiaba/araçá-guaçú/guaiaba en brésilien (**Orwaetal.,2017**).

I.1.3. Description botanique

Le Goyavier est un petit arbre avec des feuilles durables de 2 à 8 m de hauteur et d'un diamètre allant jusqu'à 40 cm à hauteur de poitrine. Cette plante peut avoir une seule tige quand plusieurs arbres sont entassés (forêt), mais ceux qui reçoivent beaucoup de lumière développent généralement des tiges secondaires partant de la tige principale près du sol. Une écorce lisse d'une couleur verte à brun rougeâtre, se détache en fines lamelles. D'une épaisseur de 5 à 8 mm, qui est présentée généralement par les branches et les tiges souvent tordues (**Penningtonet Sarukhan, 1968**). L'aubier est brun clair et le bois de cœur est brun rougeâtre, dur, lourd d'une densité de 0,8 mm et résistant (**Little et Wadsworth, 1964**). Les feuilles opposées, ont des pétioles de 4 à 7 mm de long et des lames elliptiques ou oblongues de 8 à 14 cm de long, qui sont courtes ou rondes pointues aux deux extrémités. Les fleurs sont généralement bisexuées et généralement solitaires ou regroupées en grappes de deux ou trois avec quatre ou cinq pétales blancs, et mesurent environ 2,5 cm de diamètre. Les fruits (baies) sont globuleux ou en forme de poire avec un calice proéminent et persistant qui peut être de forme sphérique à pyriformes. Ils sont d'abord durs et verts, puis deviennent plus mous et jaunes à maturité et mesurent de 3 à 5 cm de long. À l'intérieur de l'écorce fine se trouve une pulpe rose ou jaune à la saveur aigre-douce d'environ 2 mm de long d'un arôme faible à piquant (**Orwa, 2009**). La figure 02 représente le goyavier en entier.

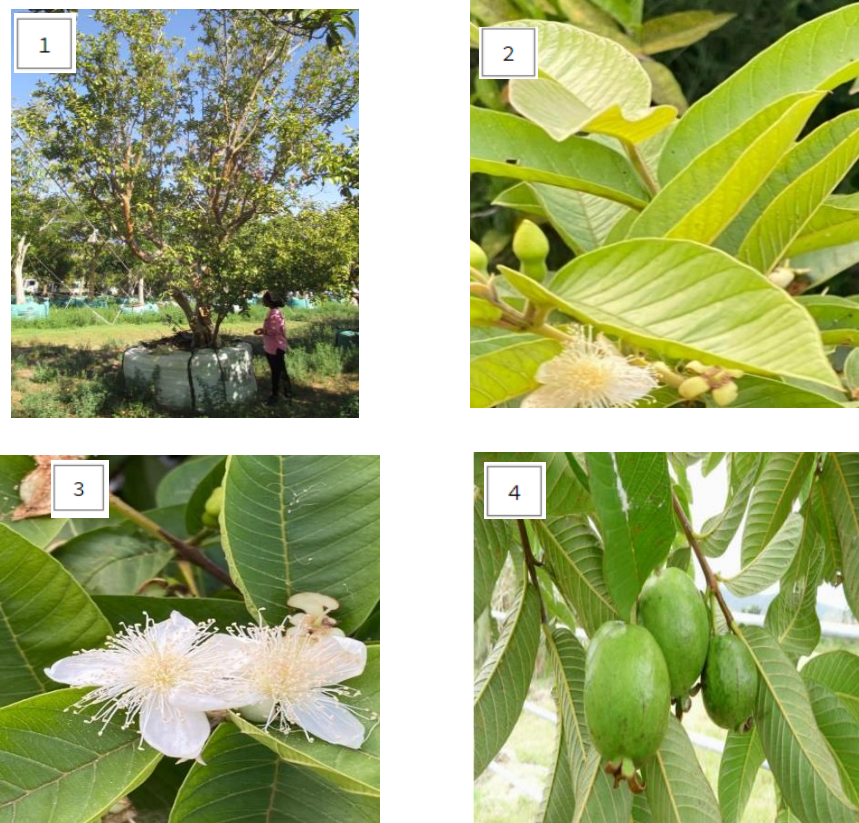


Figure 02 : Les différentes parties du goyavier ; arbre (1) ; feuille (2) ; fleur (3) ; fruit (4)
(Weli *et al.*, 2019).

I.1.4. Taxonomie

Le goyavier a été classé scientifiquement selon Dakappa *et al.*, (2013) comme suit :

Règne : Plantae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Sous-famille : Myrtoideae

Genre : *Psidium*

Espèce : Goyave

Nom binomial : *Psidium guajava* Linn.

I.1.5. Variétés

On dénombre environ 100 espèces d'arbustes tropicaux et de petits arbres dans le genre *Psidium*. A titre d'exemple : *Psidium cattleianum* Sabine connu sous l'appellation goyave fraise ; *Psidium littorale* similaire à la goyave fraise mais le fruit est de couleur jaune avec un gout citronné ; *Psidium guineense* nommé aussi goyave brésilienne, de ronde ou en poire de couleur jaune avec une saveur délicate est agréable ; *Psidium acutangulum* dit goyave de Para, fruit jaune avec une saveur beaucoup plus acide et est consommé cru ou utilisé pour aromatiser des boissons (Mitra *et al.*, 2012). Il existe d'autres sortes de goyaves telle la goyave rouge dite goyave marron mais la plus commune reste *Psidium guajava* à savoir pomme des tropiques (Missouri, 2024).

I.1.6. Climat et sol

De nature rustique, le goyavier est cultivé avec succès dans des régions dont l'altitude est de 2 000 m, une température moyenne annuelle de 15-45°C et une précipitation annuelle moyennes pouvant atteindre 1000- 2000 mm. Cet arbre apprécie mieux les sols drainés et légèrement humides, une exposition plein soleil et une gamme de sol allant de légèrement à fortement acide. Il convient de noter que la croissance et la production sont optimales sur des sols argileux riches (Orwa *et al.*, 2009) et que les pluies pendant la période de récolte détériorent la qualité du fruit (Normand, 2002).

I.1.7. Production mondiale

La production mondiale de la goyave est en augmentation de 10 pourcents durant les cinq dernières années. Parmi les principaux producteurs de la goyave on trouve l'Inde, suivi par la Chine et la Thaïlande. A titre d'exemple, le Brésil répond à la demande du marché avec une production pouvant atteindre les 90 pourcents de la goyave "Paluma", variété la plus appréciée par les consommateurs. En Inde, Chine, Kenya, Thaïlande et Indonésie la production de la goyave atteint 21 ; 4 ; 2,7 et 2,3 millions de tonnes respectivement (Tiwari *et al.*, 2013).

I.1.8. Goyavier en Algérie

Psidium guajava a été introduite au nord de l'Algérie dans les années 1950 durant la période coloniale dans un jardin botanique pour évaluer pour la première fois les activités antioxydantes et anti acétylcholinestérase des extraits de chloroforme, d'éthyle et de n-butanol de *p. guajava* poussant en Algérie (**Hazmoune et al., 2019**). En 1978, un verger de 2 hectares a été créé dans un ex-domaine agricole social (Das) à Fouka, faisant partie à l'époque de la wilaya de Blida, nommé aujourd'hui domaine M'seguem-Adelkader, sur la route de Douaouda. Abandonné en 1987, il a été repris en 1991 par Hadj Hamada, exploitant de l'EAC 11 (Exploitation Agricole Collective de 11 hectares) pour préserver la culture de ce fruit exotique. De nos jours, cet agriculteur, récolte près de 3 tonnes par an, généralement commercialisés à Fouka (**Lebbal, 2008**).

I.1.10. Utilisation du Goyavier

I.1.10.1. Utilisation traditionnelle

L'utilisation de la goyave diffère selon les régions dans le monde (Figure 3). En Chine, la médecine traditionnelle utilise le jeune fruit séché à lutter contre la dysenterie, le fruit mûr à une action bénéfique sur la rate, les feuilles comme détoxifiantes et les feuilles fraîches comme hémostatiques. L'utilisation des feuilles de goyave aide généralement à lutter contre la diarrhée, les troubles menstruels, les vertiges, l'anorexie, les problèmes digestifs, l'inflammation des muqueuses, les rhumes et la toux (**Ravi et Divyashree, 2014**).



Figure 03 : Principales utilisations traditionnelles des feuilles de la Goyave dans les pays producteurs (**Diaz-de-Cerio et al., 2017**).

I.1.10.2. Effets biologiques de la goyave

Très apprécié pour son goût sucré, la goyave possède également de nombreux atouts pour la santé. Ce fruit exotique est fort intéressant pour son apport en fibres alimentaires qui entretiennent le micro-biote intestinal. De sorte que la goyave contient presque 6 g pour une portion de 100 g de fruit, qui aident à réguler le transit intestinal et participe au contrôle de la glycémie et du mauvais cholestérol (LDL). Ce fruit possède de nombreuses propriétés médicales en luttant contre les radicaux libres et résout plusieurs maux, il est aussi indiqué contre l'anémie, car il augmente la quantité de globules rouges (**Kumar et al., 2021**).

La goyave est également appréciée pour son action antioxydante du fait qu'elle possède davantage de polyphénols que d'autres fruits. La présence de ces composés permet de lutter contre les effets nocifs des rayons UV, limiter l'apparition des rides, diminuer le risque de l'apparition de maladies cardiovasculaires et hypertension artérielle. Les polyphénols sont aussi considérés comme des remparts contre certaines formes de cancers. En effet, plusieurs recherches ont montré que les feuilles de goyave manifestent un puissant pouvoir d'inhibition sur les lignées cellulaires cancéreuses comme : MD Anderson Metastatic Breast 231 (MDAMB-231) et Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) pour le cancer du sein, cancer du col de l'utérus KB pour le cancer nasopharynx et cancer de la prostate-3 (PC-3) (**Kumar et al., 2021**).

1.11. Valeurs nutritionnelles de la goyave

La goyave fait souvent partie des super fruits, riches en fibres alimentaires, vitamines A et C, acide folique et minéraux, potassium, cuivre et manganèse. Ayant un profil généralement large et peu calorique, un seul fruit de goyave peut contenir quatre fois la quantité de vitamine C d'une orange. Différentes valeurs nutritionnelles ont été observées dans la goyave de différentes variétés. A titre d'exemple, la goyave orange et rouge présente de grande quantité de polyphénols et de caroténoïdes, des pigments antioxydants fort important pour la santé et nécessaires en tant que nutriments végétaux (**Joseph, 2011**). La goyave renferme aussi du calcium, du fer, une grande quantité de calories énergétiques et des matières grasses. C'est un véritable aliment énergisant pour lutter contre la fatigue (**Barbalhoet al., 2012**).

Partie II :
Les composés phénoliques

I.2. Généralités sur les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols constituent les groupes de substances les plus abondants et répandus dans le règne des végétaux. Selon leurs caractéristiques structurales variées, les polyphénols se répartissent en dizaine de classes chimiques, toutes reconnues par un point commun : la présence dans leur structure d'au moins d'un noyau aromatique avec un groupement hydroxyle libre ou lié. Ces composés sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse molaire peut atteindre 9000 g/mol (**Harbone, 1993**). Ils sont divisés en plusieurs catégories : coumarines, anthocyanes, quinones, lignanes, flavonoïdes, tannins, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué.

Les polyphénols sont présents dans tous les organes de la plante et peuvent être définis comme des substances indirectement essentielles à la croissance et la production des plantes, d'où la dénomination de métabolites secondaires. Ces derniers sont naturellement biosynthétisés par les plantes et contribuent à diverses fonctions biologiques allant de la signalisation et la structure à la défense entre les biotiques (infections) et abiotiques (température extrême) (**Valancience et al., 2020**). De plus, à côté des métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal (protides, glucides, lipides, acides nucléiques), les métabolites secondaires offrent une source importante que l'homme utilise dans la pharmacologie ou l'agroalimentaire. Ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales et jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (**Macheix, 2005**).

Les principales sources des polyphénols dans l'alimentaires sont les fruits et légumes fournissant environ la moitié de notre apport en ces composés. Les boissons telles que les jus de fruits ainsi que le café, le thé et le vin complètent le reste de l'apport en polyphénols (**Middleton, 2000**).

I.2.1. Classification

Les composés phénoliques peuvent être divisés en plusieurs classes et sous classes, comme l'illustre la figure 04, en fonction de la structure moléculaire, le type de liaisons formées entre elles ainsi que les groupes substituant présents dans les composés (**Singla et al., 2019**).

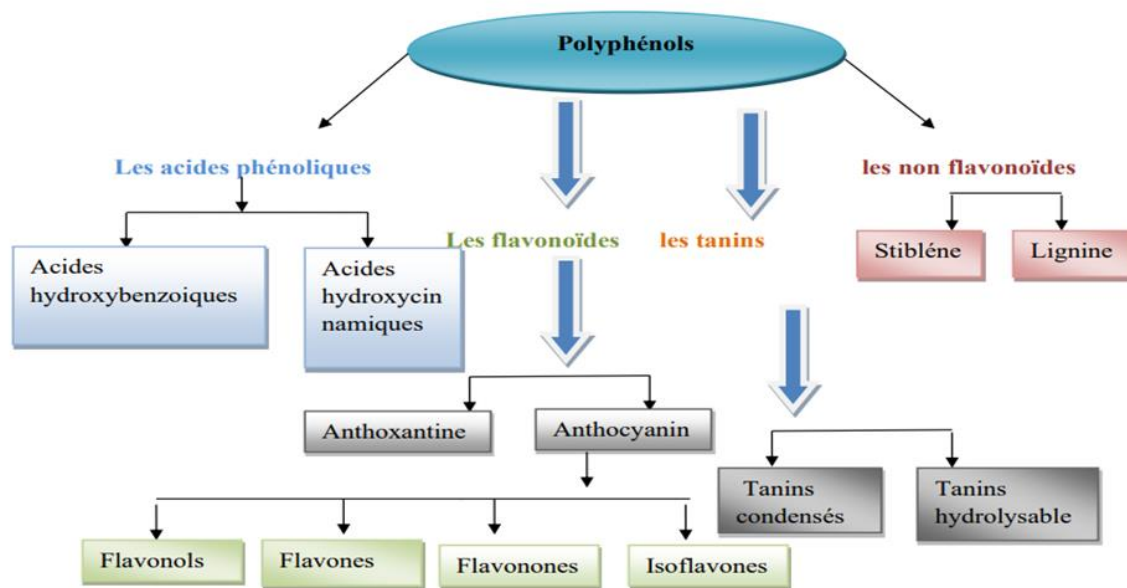


Figure 04 : Schéma illustrant les classes et sous classes des polyphénols (Singla *et al.*, 2019).

I.2.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont divisés en deux types :

Dérivés de l'acide benzoïque : tels que l'acide gallique et protocatéchique.

Dérivés de l'acide cinnamique : comme l'acide caféique, férulique et sinapique (Al Mamari, 2021).

I.2.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les groupes le plus représentatifs des composés phénoliques avec des structures chimiques variées et de caractéristiques propres. Ils sont omniprésents dans le règne végétal plus précisément dans les fruits, les légumes, les graines et les boissons tels que le thé (Ghedira, 2005). Ils se présentent dans ces derniers comme des pigments, simples ou glycosylés, ils sont responsables de leur coloration jaune, orange et rouge (Krief, 2003). Les sous-groupes de flavonoïdes comprennent la flovone, le flavonol, la flavanone, le flavanonol, l'anthocyanidine, le flavanol et l'isoflavone. Les molécules flavonoïdes ont pour particularité de changer l'activité de certaines enzymes en les inhibant ou en les activant (Ross et Kasum., 2002).

I.2.1.2.1. Structure basique des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont constitués de squelette de carbone en C6-C3-C6, une structure composée de benzo- γ -pyrone et d'un cycle phényle (Figure 05) (Ross et Kasum., 2002). La diversité structurale des flavonoïdes par rapport à l'état d'oxydation du pont carboné et l'hydroxylation donne une gamme importante de flavonoïde tels que les flavonols, anthocyanidines, anthocyanes, isoflavones, flavonones (Singla *et al.*, 2019).

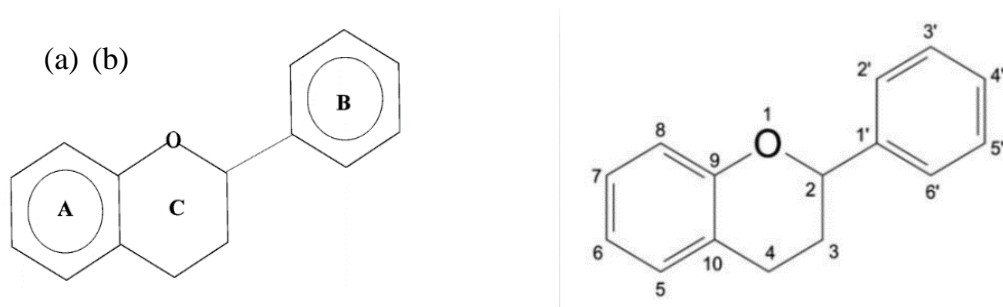


Figure 05 : Structure basique des flavonoïdes (a) ; structure commune d'un flavonoïde (b).
(Singla *et al.*, 2019).

I.2.1.2.2. Importance des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une grande importance en raison de leurs effets thérapeutiques tels que la modulation de l'activité enzymatique ainsi que leurs actions antibiotique, antiallergique, anti-diarrhéique, antiulcéreux et anti-inflammatoire. Ils jouent aussi un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Ross et Kasum, 2002).

I.2.1.3. Les tanins

Les tanins sont des composés poly-phénoliques hydrosolubles avec la propriété de tanner la peau et la transformer en cuir (Khanbabaee *et Ree.*, 2001 ; Watrelot *et al.*, 2020), une propriété liée à leur aptitude à se combiner avec des macromolécules (protéines), à précipiter les alcaloïdes et la gélatine secondaires présents chez les plantes, appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont caractérisés par une saveur astringente et sont répandues dans toutes les parties de la plante (Bruneton, 1999) et leurs propriétés chimiques uniques font d'eux de bons candidats comme colorants alimentaires, agents de traitements des eaux usées, adsorbants métalliques et antioxydants (Guo *et al.*, 2020).

I.2.1.3.1. Classification des tanins

La classification des tanins (Figure 06) se base sur leurs caractéristiques structurales et propriétés chimiques, et sont classés en deux grandes catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

- **Tanins hydrolysables** : Il s'agit d'oligo- ou poly-esters de glucides et de molécules d'acide-phénol, facilement hydrolysables par l'action des acides et tannasses en ose et en acide phénols.
- **Tanins condensés** : Il s'agit de molécules présentant une absence osidique, avec une structure voisine à celle des flavonoïdes. Non hydrolysables, en milieu acide fort, ils se polymérisent en donnant des précipités insolubles rouges bruns appelés phlobaphènes.

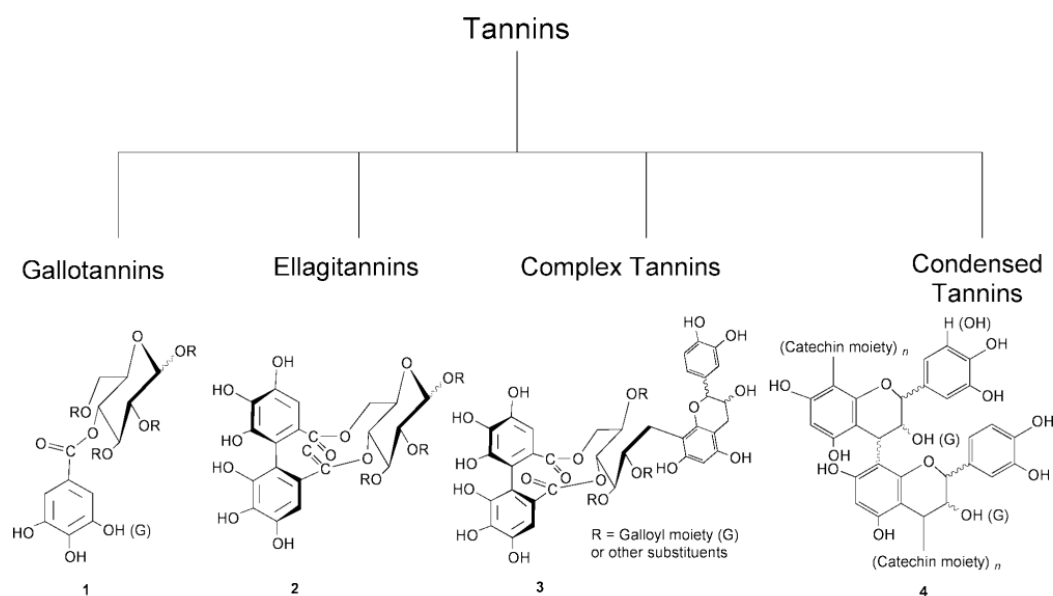


Figure 06 : Classification des tanins (Khanbabaee , Rec., 2001).

Partie III :
Les méthodes d'extraction

I.3. Méthodes d'extraction

L'extraction des principes actifs, notamment les composés phénoliques de haute valeur ajoutés à partir de matière végétale revêt d'une importance capitale pour l'isolement et l'identification des composés phénoliques, en raison de leur potentiel antioxydant significatif qui suscite un vif intérêt dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et alimentaire. Cette extraction peut être réalisée par des méthodes conventionnelles ou non conventionnelles.

I.3.1. Méthodes d'extraction conventionnelles

Les techniques d'extraction conventionnelles dites traditionnelles sont bien établies, largement employées jusqu'à nos jours. Elles impliquent l'utilisation de solvants ou de mélanges de solvants, généralement combinés à de la chaleur, pour extraire les composés souhaités (**Tambun et al., 2021**). Parmi ces méthodes il y a la macération, la décoction, le soxhlet et l'infusion.

I.3.1.1. Extraction par macération

La macération est une méthode d'extraction solide-liquide traditionnelle, c'est la méthode la plus simple. Elle implique la mise en contact de la substance végétale avec le solvant approprié comme l'eau, l'alcool ou l'huile, dans un système fermé à température ambiante. Cette opération dure généralement au moins 72 h, sous agitation périodique et peut s'étendre à plusieurs jours en absence d'agitation (**Chakraborty et al., 2011; Safdar et al., 2017**).Après l'extraction, il est essentiel d'effectuer une étape de séparation afin de distinguer les matières solides du solvant. Cette séparation est généralement réalisée par des techniques telles que la filtration, la décantation ou la clarification (**Alara et al., 2021**).

L'extraction par macération reste la plus appréciée par les chercheurs en raison de sa simplicité, sa facilité d'utilisation et son coût abordable en équipement. Cependant, cette méthode implique un temps d'extraction prolongé pouvant entraîner une dégradation des molécules actives et une consommation importante de solvants, ce qui constitue un inconvénient majeur (**Tambun et al., 2021**).

I.3.2. Méthodes d'extraction non conventionnelles

Les méthodes d'extraction non conventionnelles, telles que l'extraction assistée par micro-onde, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction par fluide supercritique,

représentent les dernières avancées technologiques dans ce domaine. Elles offrent plusieurs avantages par rapport aux méthodes conventionnelles, notamment en termes de la réduction du temps d'extraction (**Tambun *et al.*, 2021**)

I.3.2.1. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) est une méthode d'extraction qui utilise l'énergie dérivée des ondes sonores à haute fréquence (supérieures à 20 KHz) pour accélérer le processus d'extraction. Les effets majeurs des ultrasons sont attribués aux phénomènes de cavitation. En effet, lorsque des ondes ultrasonores sont appliquées à un liquide, elles génèrent des zones de basse pression qui forment des bulles de gaz, appelées cavités. Ces dernières continuent à croître jusqu'à ce qu'elles atteignent une taille critique, puis implosent rapidement (**Tabaraki *et al.*, 2012 ; Pingret, 2013**) en créant des jets microscopiques et des turbulences dans le liquide environnant. Ces mouvements agités génèrent des forces intenses qui peuvent perturber les structures cellulaires des matières premières et facilitent ainsi la libération des composés d'intérêt des cellules, les rendant plus accessibles pour l'extraction (**Rodrigues et Fernandes, 2017**).

Cette méthode présente de nombreux avantages, notamment une rapidité accrue, un meilleur rendement, une compatibilité avec des solvants respectueux de l'environnement, une facilité d'utilisation et des coûts relativement bas, ce qui en fait une méthode attrayante pour une large gamme d'applications dans divers domaines industriels et de recherche (**Rutkowska et Namie, 2017**). Cependant, la génération de chaleur peut être un obstacle à prendre en considération.

Chapitre II

Matériel et méthodes

Le présent travail repose sur l'extraction des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits préparés à partir des feuilles de *Psidium guajava* L. (goyavier). Pour cela, les objectifs fixés sont :

- ✓ Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols des feuilles de *Psidium guajava* L. par deux méthodes différentes (macération et ultrasons)
- ✓ Analyse quantitative du contenu en polyphénols des différents extraits préparés
- ✓ Evaluation de leur activité antioxydante.

I.1. Choix de la matrice végétale

Dans le présent travail, le choix de la matrice végétale s'est porté sur les feuilles du goyavier «*Psidium guajava* L » dans le but de valoriser cette espèce méconnue auprès de notre population sur leurs bienfaits santé et usage médicinal.

I.2. Echantillonnage

Les feuilles de goyavier étudié ont été récoltées durant la période octobre-novembre 2023 dans la région d'Aokas, située sur le littoral méditerranéen (Latitude: 36.6281°N Longitude: 5.2829 E) à 28 Km à l'est de la wilaya de Béjaïa.

I.3. Méthodologie

I.3.1. Préparation des échantillons

Après la récolte, les feuilles du goyavier ont été lavées plusieurs fois à l'eau pour éliminer les particules de poussière et autres contaminants. Elles ont été ensuite exposées à l'air libre dans un environnement protégé de la lumière pendant une période moyenne de 3 à 4 jours pour un séchage adéquat. Après séchage les feuilles ont été réduites en une fine poudre à l'aide d'un broyeur électrique (SKANEX, Chine), puis tamisée à travers un tamiseur électrique (Retsch, Allemagne) pour retenir au finale une granulométrie de 250 µm (Figure 1). La poudre des feuilles de goyavier obtenue a été conservée dans des flacons en verre opaque et stockée à l'abri de la lumière à une température ambiante jusqu'à non utilisation.

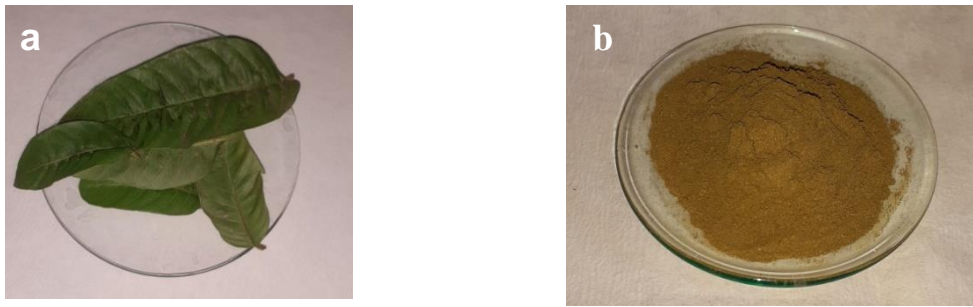


Figure 07 : Feuilles (a) et poudres(b) de *Psidium guajava* (**originale**).

I.4. Méthodes d'analyses physico-chimiques

I.4.1. Les rendements en extrait secs

Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage et définis comme le rapport entre la masse obtenue après extraction (mf) et la masse de la matière végétale utiliser (mi) il est calculer selon la formule suivante :

$$R (\%) = \left(\frac{mf}{mi} \right) \times 100$$

Avec

R : le rendement de l'extraction (%). mf : Masse de l'extrait sec(g). mi : poids de la poudre soumise à l'extraction (g)

I.4.2. Taux d'humidité

La teneur en humidité a été déterminée selon la méthode décrite par Afroze *et al.*, (2015). Une quantité précise de poudre de feuilles de *Psidium guajava* a été déshydratée dans une étuve à 105°C jusqu'à ce que son poids reste constant. Le taux d'humidité (H) a été calculé en utilisant la formule suivante :

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

Avec : H(%) représente le taux d'humidité en pourcentage ; P_{av} et P_{ap} représentes, respectivement, le poids (g) de l'échantillon avant et après séchage.

I.4.3. Teneur en sucre (Brix)

Le degré Brix mesure le pourcentage en sucres d'une substance via un refractomètre ainsi que l'indice de réfraction de la lumière d'une matrice (Abidi *et al.*, 2017). Cet indice

s'observe par la déviation d'un faisceau lumineux suivant la nature du milieu dans lequel il se propage.

Pour ce, quelques gouttes d'échantillon ont été déposées entre deux surfaces du prisme du réfractomètre (Annexe 01). La valeur de Brix a été directement lue sur l'échelle de graduation.

I.4.4. Mesure du pH

La mesure du pH d'une solution dépend de sa concentration en ions oxonium (H_3O^+) présent dans une solution (**Buck et al., 2003**). Pour cela, le pH mètre a été étalonné au préalable avec des solutions tampons (pH 4 et pH 7), puis l'électrode du pH-mètre a été immergée dans un bécher contenant 100 ml d'extrait hydroéthanolique des feuilles de goyavier. La valeur du pH est obtenue par simple lecture sur l'écran du pH-mètre (Annexe 02).

I.4.5. Mesure de la conductivité

La conductivité électrique est une mesure de la capacité d'un matériau à conduire un courant électrique, exprimée en siemens par mètre (S/m). Elle dépend de la concentration d'ions présents dans la solution, ou une concentration plus élevée en ions entraîne une conductivité plus grande. La conductivité est utilisée pour évaluer la pureté d'une solution ou suivre les réactions chimiques (**Belhaj et al., 2015**).

Le principe de la mesure est identique à celui du pH, de sorte que l'électrode de l'appareil a été immergée dans un bécher contenant 100 ml d'extrait des feuilles de goyavier. La mesure de la conductivité est établie par simple lecture de la valeur affichée sur l'écran du conductimètre (Annexe 03).

I.5. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques est une étape importante avant de franchir le pas vers l'analyse quantitative et/ou qualitative. Elle est influencée par différents paramètres comme la méthode d'extraction, le solvant d'extraction, la température et le temps d'extraction, le pH, le rapport de la quantité de matière, etc. L'optimisation de ces paramètres est nécessaire pour obtenir un bon rendement des composés phénoliques de haute qualité (**Chowdhury et al., 2020**).

Dans la présente étude, deux méthodes d'extraction des composés phénoliques ont été réalisées : l'extraction par macération et par ultrason.

I.5.1. Extraction par macération

La macération a été faite avec la poudre des feuilles du goyavier en faisant varier le temps, les concentrations du solvant éthanol (0, 50 et 100 %) et le ratio (1g à 3g) dans un volume de 100 ml et à la température ambiante. Après chaque opération d'extraction, l'extrait obtenu a été filtré à travers du papier filtre sur un entonnoir de Büchner sous vide, puis centrifugé à 6000 tr/min pendant 10 min. Un nombre de 15 extraits différents ont été obtenus et conservés au frais dans un flacon en verre (Annexe 04).

I.5.2. Extraction par ultrason

L'extraction accélérée a été réalisée par l'appareil ultrason (Annexe 05) dans les mêmes conditions fixées dans l'extraction par macération. Des ballons à fond rond de 100 mL, contenant un volume de 100ml de l'extrait des feuilles ont été partiellement immergés dans un bain d'eau isotherme à une température de 25°C. La puissance de l'appareil a été variée (20, 40 et 60W) pour un temps d'extraction de 5, 10 et 15 min, et cela pour chaque puissance. L'extrait a été par la suite filtré, centrifugé puis conservé au frais dans des flacons. Un nombre de 45 extraits ont été obtenus via cette méthode d'extraction.

I.6. Modélisation et optimisation du processus d'extraction

L'influence des paramètres du processus d'extraction, à savoir la concentration du solvant (éthanol), le temps d'extraction et le rapport solvant/solide pour l'extraction par une méthode conventionnelle (macération) et l'influence des mêmes paramètres du processus d'extraction par une méthode non conventionnelle l'ultrason a été étudiée à l'aide d'un test à 3 facteurs afin de déterminer la gamme préliminaire de variables d'extraction.

Sur la base des résultats expérimentaux, les principaux facteurs influençant le processus d'extraction ont été sélectionnés pour concevoir des expériences à l'aide d'un plan de Box Behnken, et la méthodologie de la surface de réponse (RSM). Une méthodologie statistique effectuée à l'aide du logiciel JMP (John's Macintosh Project), qui est appliquée sur un ensemble de données dédiés à établir une relation entre les variables. En utilisant un plan expérimental à 3 facteurs et 3 niveaux, les variables doivent être codées (Tableau I et II). Les

données sont analysées à l'aide de la technique de régression multiple pour développer un modèle de surface de réponse illustrée dans les représentations tridimensionnelles du plan de Box-Behnken.

Une équation polynomiale de second degré doit être appliquée pour ajuster les réponses des données expérimentales aux variables codées, comme suit :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i<j}^n \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Y : fonction de réponse

β_0 : constante polynomiale qui exprime l'effet moyen général

β_{ij} : coefficients des effets linéaires, quadratiques.

$X_i X_j$; représentent les variables codes indépendant

Ce type de méthodologie permet de déterminer ; les erreurs de prévision, le coefficient de corrélation r^2 et la probabilité p, en vue d'une détermination des variables du processus d'extraction affectant le taux de composés phénoliques des feuilles du goyavier (**Bajić et al., 2020; Singh et al., 2015**).

Tableau I: Codage des différentes variables pour l'extraction par macération.

Variables	Niveau	Codage
Temps	08 heures	-1
	16 heures	0
	24 heures	+1
Ratio	1 g	-1
	2g	0
	3g	+1
Concentration du solvant	0 %	-1
	50 %	0
	100 %	+1

(-1) minimum, (0) moyenne, (+1) maximum

Tableau II: Codage des différentes variables pour l'extraction par ultrason.

Variabiles	Niveau	Codage
Temps	05 min	-1
	10 min	0
	15 min	+1
Ratio	1 g	-1
	2g	0
	3g	+1
Concentration du solvant	0 %	-1
	50 %	0
	100 %	+1

(-1) minimum, (0) moyenne, (+1) maximum

I.6. Dosage des composés phénoliques

I.6.1. Réactifs

Dans le cadre de cette étude, plusieurs réactifs ont été employés pour l'extraction et l'analyse des composés phénoliques des feuilles de *Psidium guajava* L. Ces réactifs sont essentiels pour assurer la précision et l'efficacité des procédures expérimentales. Les principaux réactifs utilisés ainsi que leurs rôles sont donnés en (Annexe 06).

I.6.2. Dosage des composés phénoliques totaux

La concentration des composés phénoliques totaux (CPT) a été déterminée selon la méthode décrite par Alimi et al., (2011) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu qui est constitué d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Ces acides peuvent être réduits par les composés phénoliques, en milieu alcalin, en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques totaux.

Un volume de 100 μ L de chaque extrait a été mélangé avec 2 mL de $NaCO_3$ à 2% (après une dilution adéquate). Après 2 min d'incubation à température ambiante, 100 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (50/50 v/v) ont été ajoutées au mélange, puis incubé à

l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 760nm par spectrophotométrie (BIOTECH ENGINEERIG UV-9200) contre un blanc.

La concentration en composés phénoliques totaux (CPT) a été évaluée en référence à la courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (Annexe 07). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

I.6.3. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes contenus dans chaque extrait a été réalisée en suivant la méthode décrite par Djeridane et al., (2006). Cette méthode est basée sur la propriété des flavonoïdes à former des complexes jaunes par liaison de leurs atomes d'oxygène présents sur les carbones C4 et C5 avec des métaux tels que l'aluminium présent sous forme de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$).

Un volume de 1mL de solution $AlCl_3$ à 2% et 1 mL de chaque extrait a été mélangé, puis agités et incubé pendant 15 min à l'obscurité à une température ambiante. La lecture des absorbances a été réalisée par spectrophotomètre contre un blanc à 430 nm. La quantité de flavonoïde a été déterminé en se référant à une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions avec de la quercétine (Annexe 07). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS)

I.6.4. Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés ont été dosés suivant la méthode de Sun *et al.*, (1998). Un volume de 250 μ l de chaque extrait a été ajouté à 1,5ml de solution vanilline préparé à 4%, auquel ont été additionné 750 μ l de HCL. Après agitation, le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 15 min. La lecture des absorbances a été réalisée par spectrophotométrie (BIOTECH ENGINEERIG UV-9200) contre un blanc à 500 nm.

En se référant à une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions avec de la catéchine (Annexe 07). La teneur en tanins condensés est déterminée et les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g MS).

I.7. Evaluation de l'activité antioxydant par piégeage du radical libre DPPH

- **Principe :**

La molécule de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) (Figure 08) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, le DPPH[•] se transforme en espèce non-radicalaire, le DPPH (diphénylpicryl-hydrazine) qui se traduit par un changement de sa coloration violette en jaune (**Brand-Williams *et al.*, 1995**).

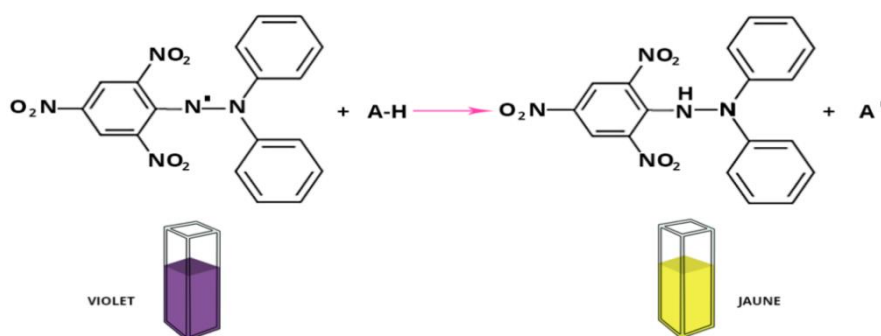


Figure 08: La structure chimique du radical libre DPPH (couleur violette) et sa forme réduite (couleur jaune).

A signaler, que l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. Ainsi plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort (**Mansouri *et al.*, 2005**).

- **Mode opératoire**

L'activité anti-radicalaire des extraits vis-à-vis du DPPH est déterminée selon le protocole décrit par Brand-Williams *et al.*, (1995). La solution DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100mL de méthanol. Un volume de 50 μ L d'extrait est additionné à 1,950 mL de la solution de DPPH. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm par rapport à un blanc. Une gamme d'étalons au Trolox a été réalisée pour déterminer le potentiel antioxydant de chaque extrait vis-à-vis du radical DPPH en capacité antioxydant équivalent au Trolox (TEAC) par gramme de matière sèche (Annexe 07).

Le pourcentage d'inhibition (% I) du radical libre DPPH(%) est calculé selon la formule suivante :

$$\% I = \frac{\text{AbsC} - \text{AbsE}}{\text{AbsC}} \times 100$$

Avec : % I, représente le pourcentage d'inhibition, AbsC et AbsE représente, respectivement, l'absorbance de la solution DPPH méthanolique en absence de l'extrait et en présence de l'extrait.

- Contrôle négatif, correspondant à 50 µL de solvant d'extraction + 1,95mL de la solution méthanolique de DPPH.
- Contrôle positif, ou l'acide ascorbique est utilisé dans les mêmes conditions que l'extrait.

Les concentrations d'CI50 correspondant à la concentration de l'extrait nécessaire pour réduire 50% d'inhibition du DPPH ont été calculées graphiquement par la régression logarithmique des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de chaque extrait testé.

I.8. Analyses statistiques

Les résultats des analyses effectuées représentent la moyenne de cinq essais. Les paramètres de la statistique descriptive (moyennes et écart types) ont été calculés à l'aide du programme Excel de Microsoft office 7. L'analyse de la variance entre les différents échantillons étudiés a été réalisée au test ANOVA-LSD du logiciel STATISTICA 7.12 à niveau de signification de 0,05.

Chapitre III

Résultats et discussions

II.1. Optimisation d'extraction des composés phénoliques à partir de la poudre de feuille de *Psidium guajava* L

Durant notre étude expérimentale, nous avons réalisé 15 extractions pour chaque méthode macération (MAC) et ultrason (US) afin de mettre en place une étude qui consiste à analyser et à traiter des données expérimentales, en vue d'estimer la désirabilité des erreurs, prédire le coefficient de corrélation et enfin prévoir un modèle type, ayant les meilleurs teneurs en composés phénoliques.

II.1.1. Ajustement des moindres carrés

La distribution des nuages de points des réponses de la teneur en phénols totaux des deux méthodes illustrées sur la figure 09 ci-dessous sont assez proches de la droite. De plus ayant un coefficient d'ajustement $R^2 = 0,99$ proche de 1 et un $P < 0,05$ (Annexe 11 et Annexe 12), donc il s'avère qu'il y a une bonne corrélation significative entre les résultats des échantillons et l'estimation des erreurs est minimale.

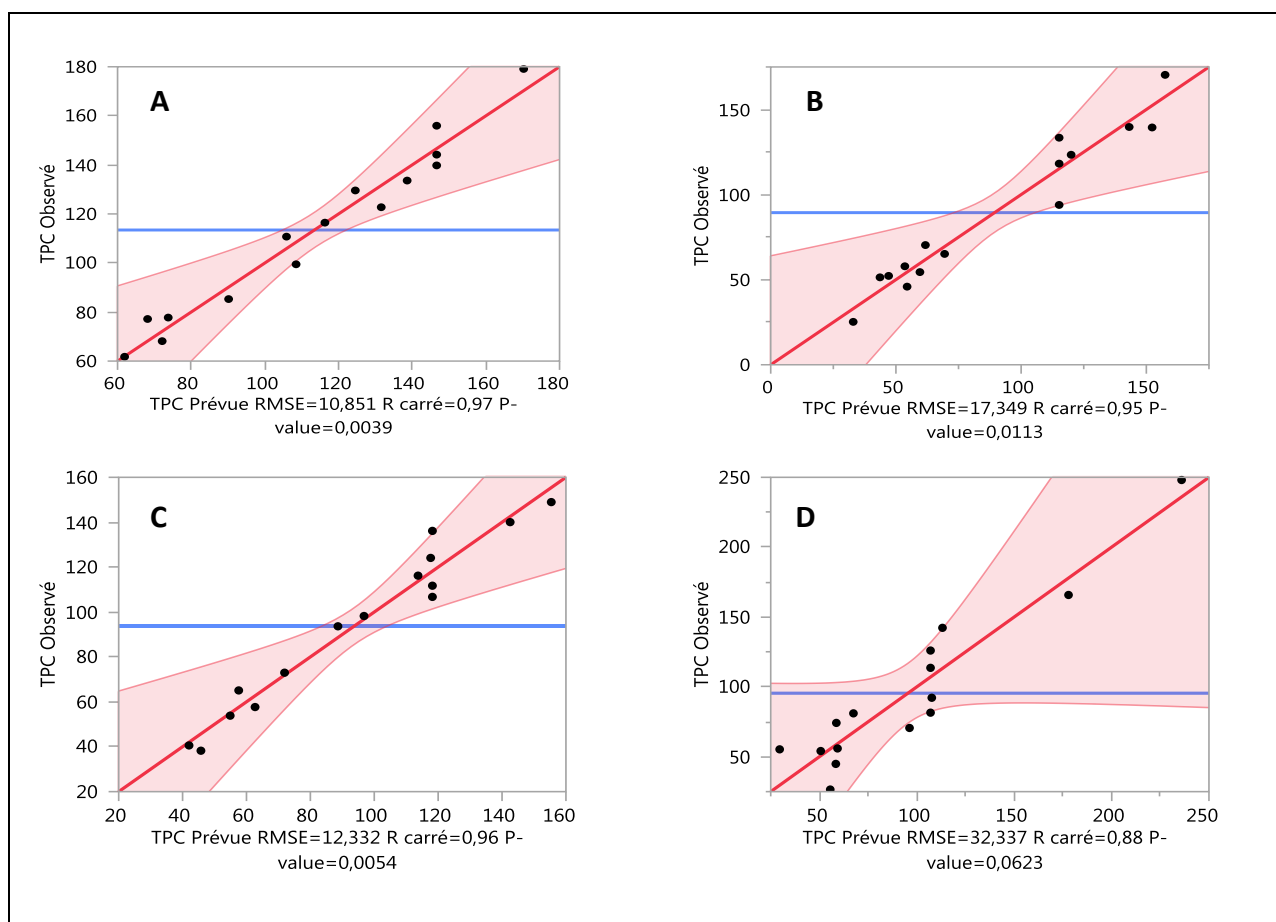


Figure 09 : La distribution des nuages de points des réponses de la teneur en phénols totaux des deux méthodes d'extraction (A: macération, B: ultrason20%, C: ultrason 40%, D: ultrason60%).

II.1.2. Profileur de prévision

L'optimisation nous a permis d'étudier l'influence de différents facteurs à savoir ; le temps d'extraction, le ratio et la concentration du solvant sur le critère de teneur en phénols totaux ; afin de tirer profit de la meilleure prévision d'extrait (macération et ultrason). Ainsi pour :

- L'extraction MAC : Un temps de 24heures, un ratio de 1g, une concentration d'éthanol à 57.58 %, nous avons obtenu une teneur prédite en phénols totaux de 171,56 mg EAG/g MS (Figure 10).
- US 20 % : Un temps de 5minutes, un ratio de 3g, une concentration d'éthanol à 45 %, nous avons obtenu une teneur prédite en phénols totaux de 158,2 mg EAG/g MS (Figure 11).
- US 40 % : Un temps de 15 minutes, un ratio de 1g, une concentration d'éthanol à 61 %, nous avons obtenu une teneur prédite en phénols totaux 158.16 mg EAG/g MS (Figure 11).
- US 60 % : Un temps de 15 minutes, un ratio de 1g, une concentration d'éthanol à 50 %, nous avons obtenu une teneur prédite en phénols totaux 235.96 mg EAG/g MS (Figure 11).

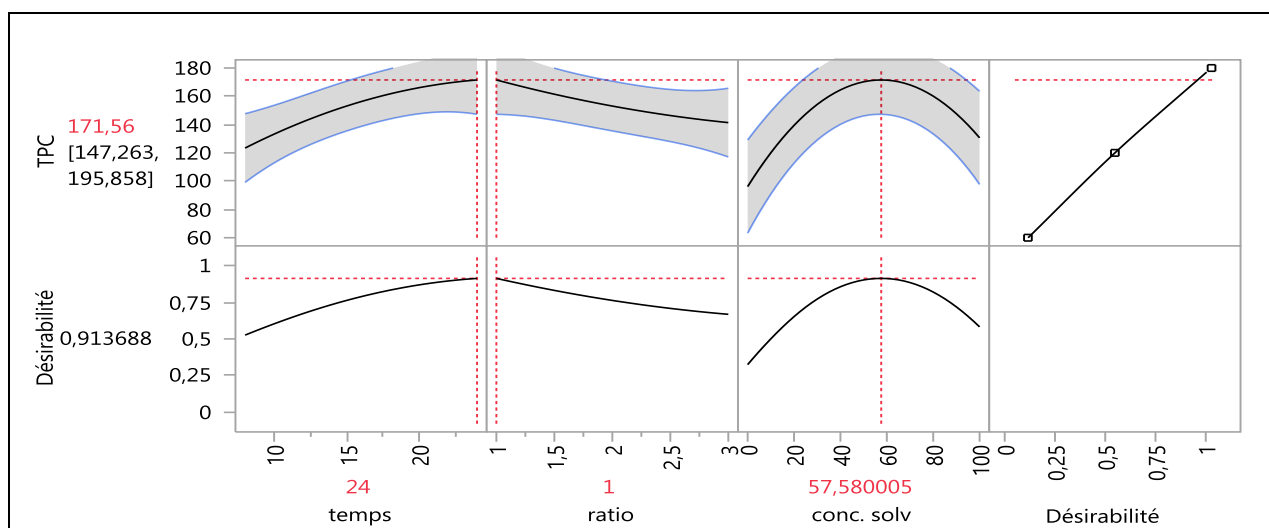


Figure 10 : Profileur résultats de prévision (paramètres optimaux de l'extraction par macération des composés phénoliques).

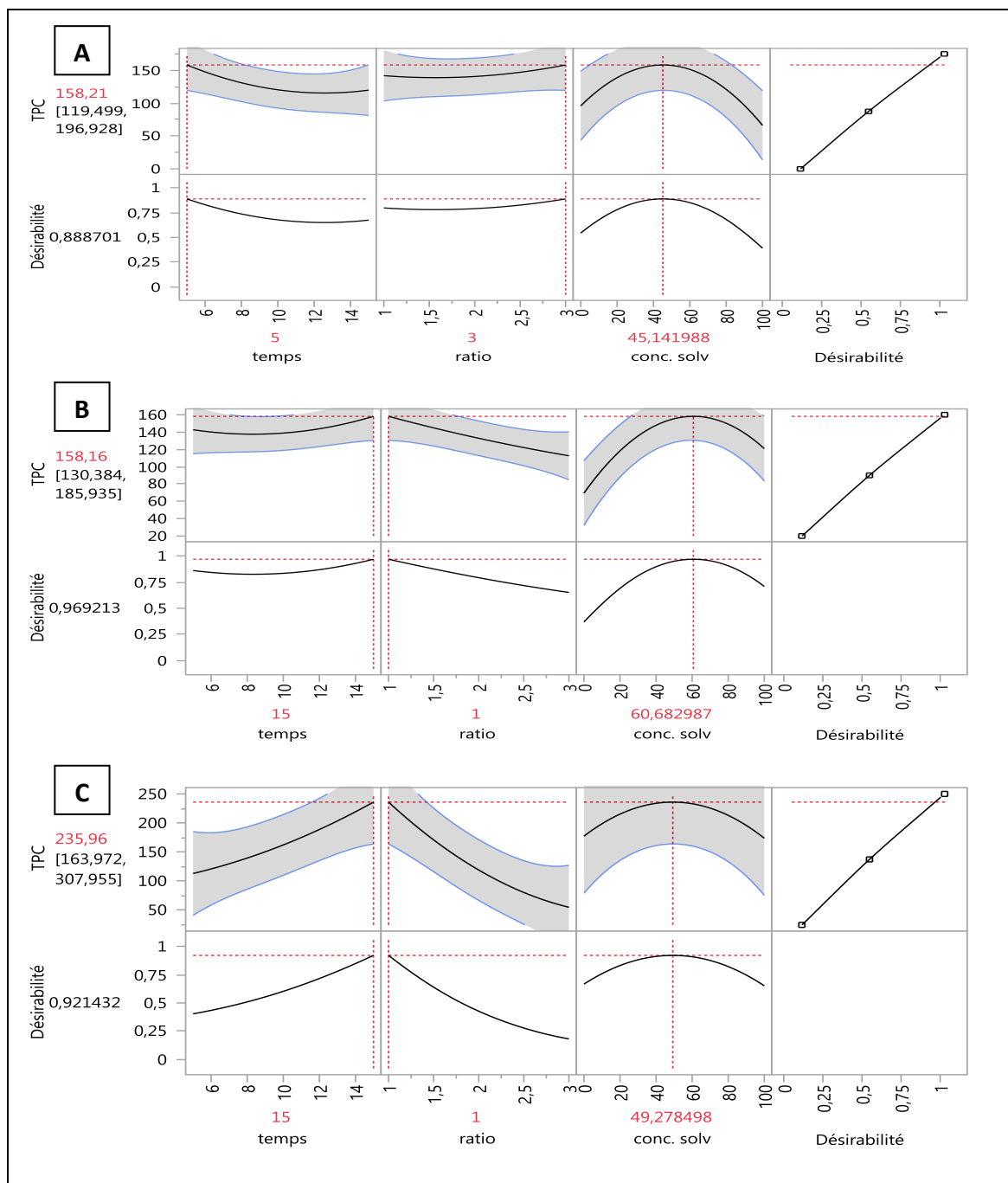


Figure 11 : profileur Résultats du de prévision (paramètres optimaux de l'extraction par l'ultrason des composés phénoliques) (A: ultrason20%, B: ultrason 40%, C: ultrason60%).

II.2. Caractérisation physico-chimique

La poudre de feuilles de *Psidium guajava* analysée a montré un taux d'humidité de 13%.

Les résultats des analyses physico-chimiques des extraits de feuilles de goyavier obtenus par les deux méthodes étudiées sont présentés dans le tableau III, un pH relativement

constant, avec une moyenne de 5.48. La teneur en sucre, exprimée par le degré Brix des extraits, se situe entre 15 et 18 % et la conductivité de ces extraits varie de 37,2 à 125,8 S/m.

Tableau III : Résultats d'analyse physico-chimique des extraits de feuilles de goyavier.

Extrait	pH	Conductivité (S/m)	Degré de Brix (%)
MAC	5,589	88,5	15,10
US 20 %	5,195	125,8	15
US 40 %	5,406	53,7	18
US 60 %	5,73	37,2	15,80

MAC : Extrait par macération, US : Extrait par ultrason

Les résultats de pH et de degré de Brix obtenus sont supérieurs à ceux rapportés par **Krishi Vidyapeeth et al., (2020)**, qui ont trouvé des valeurs de pH de 3,9 et un degré de Brix de 11,4 %.

II.3 Les rendements en extrait secs

Les quatre extraits bruts dans l'aspect physique sous forme de poudre cristalline est d'une couleur marron que ce soit par macération ou par ultrason.

Les rendements d'extraction ont été calculés et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau IV: Les résultats du rendement d'extraction des feuilles de *Psidium guajava*. L

Echantillon	Méthode	Rendement (%)
Feuilles	Macération	26.6
	Ultrason	US 20 % : 8.80
		US 40 % : 9.68
		US 60 % : 8.74

Dans notre étude, les résultats des rendements en extrait obtenus des feuilles de *Psidium guajava* varient de 8,74 à 26,6 %. La méthode de macération correspond en meilleur rendement obtenu avec un pourcentage de l'ordre de 26,6 % pour un solvant d'extraction

éthanol à 50 %. À l'inverse de la méthode par ultrason (US 60 %) qui a donné le plus faible rendement estimé à 8.74 %.

D'après les résultats enregistrés par N'Guessan-irie *et al.*, (2012), l'extrait aqueux de feuille de *Psidium guajava* a enregistré un rendement de 9.2 % qui est un rendement inférieur comparé à celui de l'extrait MAC dans nos conditions mais qui s'avère proche du rendement d'extraction par ultrason.

II.4. Teneur en composés phénoliques et activité antioxydant

II.3.1. Teneur en composés phénolique totaux

L'analyse des résultats de la teneur en composés phénoliques totaux (CPT) des extraits obtenus par macération et ultrasons à différentes puissances montre des variations significative ($P < 0.05$). Les teneurs en CPT de l'extrait par macération sont beaucoup plus élevée (179,11 mg EAG /g MS) par rapport à celle d'extrait par ultrason ou l'extrait US 40 % présente une teneur maximale de 152.59 mg EAG /g MS pour cette technique d'extraction (Figure 12).

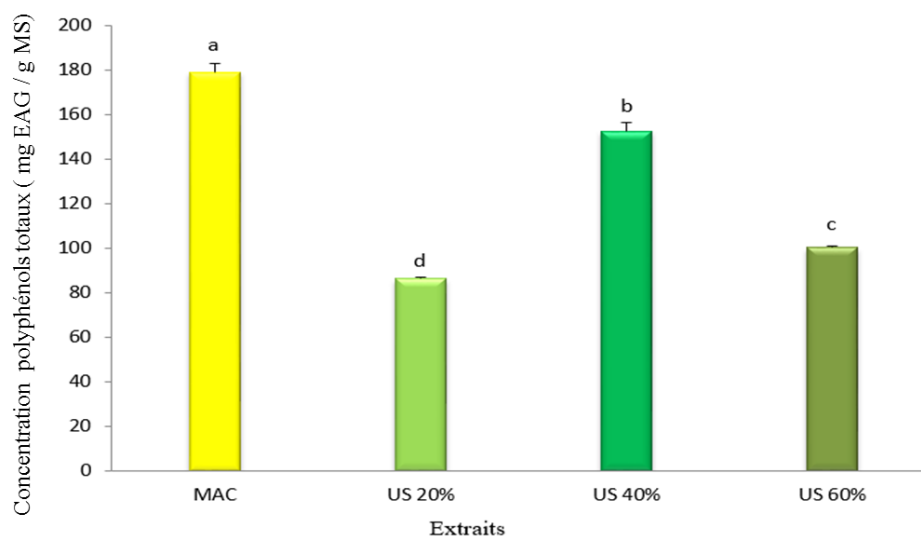


Figure 12 : La teneur en composés phénoliques totaux des extraits obtenus par les deux méthodes. (Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm écart type. Les barres verticales représentent l'écart types. Les valeurs portant des lettres déférentes sont statistiquement différentes. MAC : Extrait par macération, US : Extrait par ultrason)

Les résultats de teneur en composés phénoliques totaux (CPT) obtenus dans cette étude, soit 178,87 mg EAG/g, sont très proches de ceux rapportés par **Seo *et al.*, (2014)** qui ont rapportés 185 mg EAG/g d'extrait de feuille par macération et avec le même solvant (éthanol 50 %). En revanche, nos résultats sont nettement inférieurs à ceux rapportés par **Amaral *et al.*, (2020)** avec une teneur de 574,4 mg EAG /g et ceux de **Braga *et al.*, (2014)** qui ont rapporté une teneur de $766,08 \pm 14,52$ mg/g.

Ces différences marquées mettent en évidence l'importance cruciale des conditions d'extraction et des caractéristiques spécifiques des matériaux végétaux utilisés.

II.4. Teneur en flavonoïdes

Les résultats de l'analyse ANOVA révèlent des différences significatives dans la concentration en flavonoïde des extraits de feuilles de goyavier (figure13) obtenus par les deux méthodes d'extraction (macération et ultrason à différentes puissances). En effet la méthode de macération a produit un extrait riche en flavonoïdes avec une concentration de 4.09 mg EQ/g MS. En revanche, l'extrait US 40% présente une concentration la plus faible avec une teneur de 0.29 mg EQ/g MS.

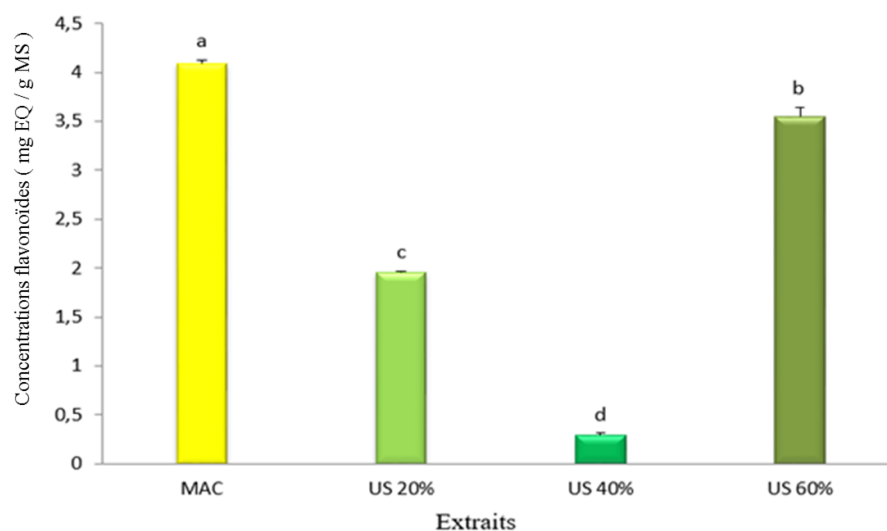


Figure 13 : La teneur en flavonoïdes des extraits obtenus par les deux méthodes. (Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm écart type. Les barres verticales représentent l'écart types. Les valeurs portant des lettres différentes sont statistiquement différentes. MAC : Extrait par macération, US : Extrait par ultrason).

Les résultats obtenus en flavonoïdes montrent des teneurs supérieures en comparaison à celles rapportées par **Ademiluyi et al., (2016)** pour les extraits de feuilles de goyavier obtenus par macération 24h, qui varient de 0,434 mg EQ/g à 0,563 mg EQ/g. En revanche, ils sont proches de ceux trouvés par **Nwozo et al., (2014)**, qui ont rapporté 4,35 mg/g pour des extraits à l'éthanol 80%. Ces comparaisons mettent en évidence la richesse en flavonoïdes de nos extraits, corroborant les valeurs élevées trouvées par certaines études antérieures.

II.5. Teneur en tanins condensés

Les résultats du dosage en tanins des extraits de feuilles de *Psidium guajava* sont représentés dans la figure ci-dessous. L'analyse statistique des données a montré une différence significative entre tous les extraits ($p < 0.05$).

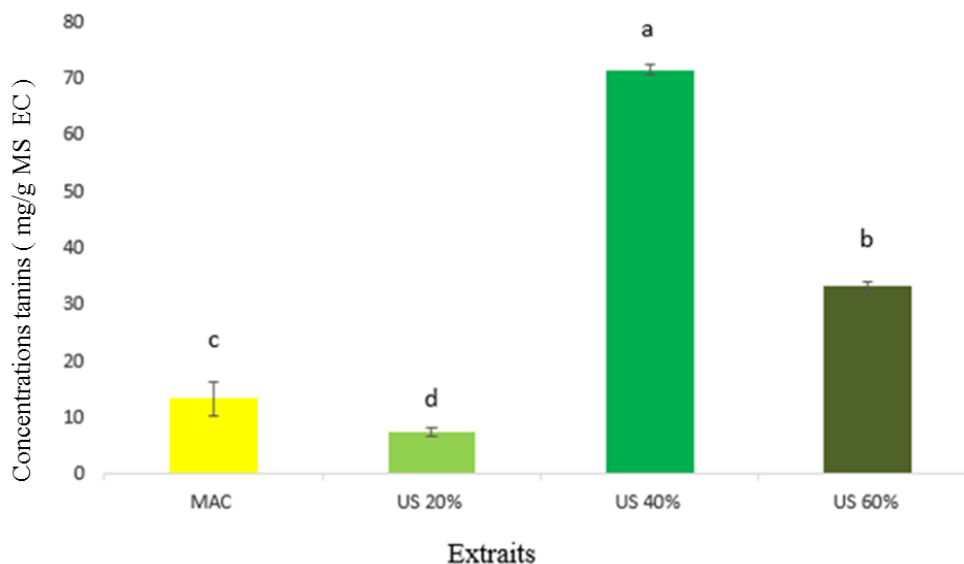


Figure 14 : Teneur en tanins condensés obtenus par les deux méthodes. (Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm écart type. Les barres verticales représentent l'écart types. Les valeurs portant des lettres différentes sont statistiquement différentes. MAC : Extrait par macération, US : Extrait par ultrason).

La concentration des tanins dans l'extrait US 40 % s'avère la plus élevée avec une teneur de 71,43 mg /g MS tant dis l'extrait par macération montre une concentration moindre avec celle de l'extrait US 20 %.

Ces résultats sont supérieurs à ceux rapportés par **Mailoa et al., (2013)** pour des extraits de feuilles de *Psidium guajava* qui affichent une teneur en tanins de 1.728 mg/g et 1.835 mg/g pour des extraits à 50 % d'éthanol et 70 % d'éthanol respectivement.

Comme le soulignent différents auteurs (Seo *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2014 ; Mailoa *et al.*, 2013) les différents extraits de *Psidium guajava* affichent des teneurs variables en composés phénoliques.

L'efficacité de l'extraction des composés phénoliques à partir d'une matrice végétale est influencée par la polarité des solvants d'extractions et dépend du nombre de groupes hydroxyles inclus dans les structures de ces composés et de leur solubilité (Naczek *et al.*, 2006) , De telles différences peuvent être aussi attribuées au degré de polymérisation des composés phénoliques, à leur diversité structurale (Naczek *et al.*, 2006), ou à leur implication dans d'autres structures moléculaires formant ainsi avec d'autres composants (glucides et protéines) des complexes insolubles (Cecace *et al.*, 2002 ;Falleh *et al.*, 2008).

II.3.2. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH

Les résultats de mesure de l'activité anti radicalaire de nos extraits sur le radical DPPH (Figure 15) révèlent une différence significative ($p < 0.05$) entre les différents extraits testés.

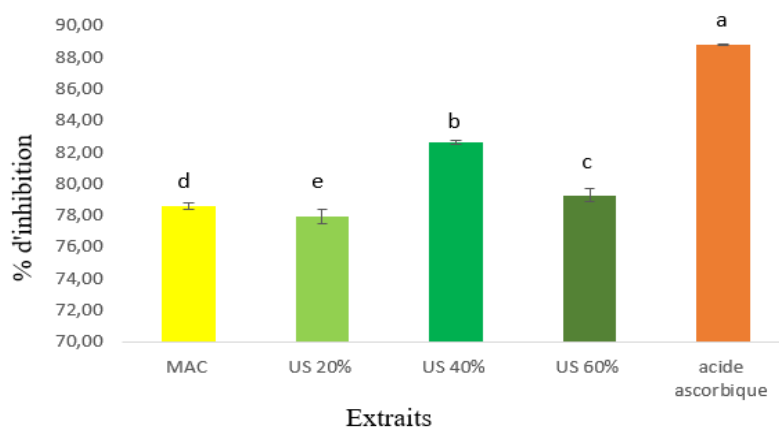


Figure 15 : Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH obtenus par les deux méthodes (Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm écart type. Les barres verticales représentent l'écart types. Les valeurs portant des lettres différentes sont statistiquement différentes. MAC : Extrait par macération, US : Extrait par ultrason).

Tous les extraits montrent une activité anti-radicalaire nettement plus faible comparée à celle de l'acide ascorbique pris comme standard.

Les résultats illustrés par la figure 05 montrent que l'extrait US 40% montre le pourcentage d'inhibition le plus élevé (82.62%), tant dis que l'extrait US 20% et l'extrait MAC présente le pourcentage le plus faible (77,94 % et 78.57% respectivement).

Les résultats obtenus sont supérieurs à ceux rapportés par **Nwozo et al., 2014**, qui ont observé un pourcentage d'inhibition de 62,84 % pour l'extrait de feuilles de *Psidium guajava* avec de l'éthanol 80 % et une macération de 72h.

D'autre part des similitudes ont été enregistrées par **Musa et al., 2011** où le pourcentage d'inhibition du DPPH est de 84,86 % pour l'extrait par ultrason et de 78,62 % à 81,18 % pour l'extrait par macération. **Braga et al., (2014)** ont rapporté un pourcentage d'inhibition légèrement supérieur (87,65 %) comparé à nos résultats pour les deux méthodes.

La figure ci-dessous représente un histogramme des CI50 concentrations nécessaires pour obtenir la concentration d'inhibition DPPH à 50 % (exprimée en µg/ml) pour différents extraits de feuilles de goyavier, comparés à la CI50 de l'acide ascorbique.

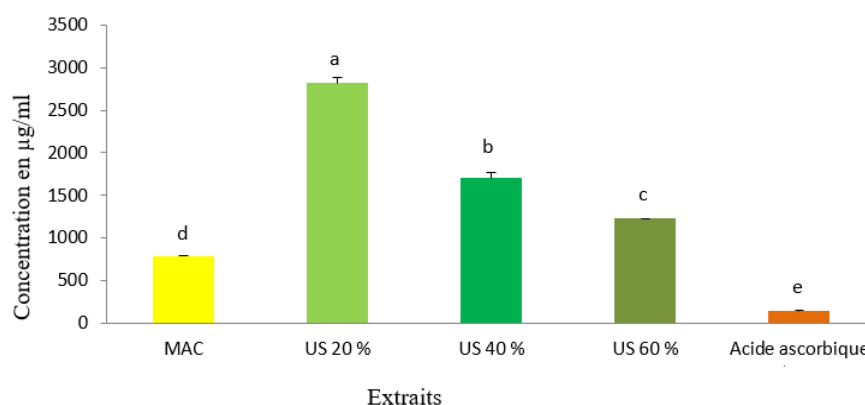


Figure 16 : Les valeurs des CI50 des extraits obtenus par macération et ultrason avec l'acide ascorbique. (Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm écart type. Les barres verticales représentent l'écart types. Les valeurs portant des lettres différentes sont statistiquement différentes. MAC : Extraite par macération, US : Extrait par ultrason).

L'analyse des valeurs des CI50 des extraits de feuilles de *Psidium guajava* ont montré un faible pouvoir antioxydant avec des valeurs de CI50 de 791,5 µg/ml et de 1228,49 à 2817,86 µg/ml pour les extraits MAC et US respectivement par rapport à l'acide ascorbique avec une valeur d'CI50 de 136,63 µg/ml.

Les résultats d'Ahda *et al.*, (2019) et de Braga *et al.*, (2014) pour des extraits éthanoliques de feuilles de *Psidium Guajava* affichent une valeur de CI50 la plus faible ($7,73 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$ et $185,15 \mu\text{g/ml}$) par rapport à celles de nos extraits CI50 de $791,5 \mu\text{g/ml}$ à $2817,86 \mu\text{g/ml}$). Par ailleurs, en comparant les valeurs des CI50 de nos extraits à ceux obtenus par Dias *et al.*, 2022, pour des extraits du fruit de la même plante les valeurs de IC50 sont de $3570 \mu\text{g/ml}$ pendant la saison sèche et de $3600 \mu\text{g/ml}$ pendant la saison des pluies, ces valeurs de CI50 sont 4 fois plus grandes que celles obtenues avec l'extrait MAC ou la valeur de CI50 n'est que de $791,5 \mu\text{g/ml}$ et 03 fois supérieurs à celle obtenue pour l'extrait US 60% (CI50= $1228,49 \mu\text{g/ml}$).

Des corrélations entre la teneur en composés phénoliques et le test du pourcentage d'inhibition du DPPH ont été notées (Annexe 13). Les composés phénoliques totaux des extraits de feuille de goyavier sont faiblement corrélés ($R^2 = 0,36$) avec le test d'inhibition du DPPH ainsi que les flavonoïdes qui montrent une corrélation négative ($R^2 = -0,70$). D'autre part, de fortes corrélations sont enregistrés pour les tannins avec un coefficient de corrélation de $R^2 = 0,97$. Cela veut dire que les tanins sont largement impliqués dans l'activité de piégeage du radical DPPH.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La présente étude a été consacrée à l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des feuilles du goyavier par la Méthodologie de Surface de Réponse (MSR).

Cette étude a évalué l'efficacité de deux méthodes d'extraction pour obtenir les composés bioactifs des feuilles de goyave, les quantifier et évaluer leur activité antioxydante. L'optimisation des conditions optimales d'extraction des composés phénoliques par le biais d'un modèle Box Behnken a permis d'obtenir les résultats suivants :

- L'extraction par macération : Un temps de 24 heures, un ratio de 1g, une concentration d'éthanol à 57.58 %. L'extraction par ultrason ; US 20 % : Un temps de 5 minutes, un ratio de 3g, une concentration d'éthanol à 45 %, US 40 % : Un temps de 15 minutes, un ratio de 1g, une concentration d'éthanol à 61 % et US 60 % : Un temps de 15 minutes, un ratio de 1g, une concentration d'éthanol à 50 %.

Les analyses physico-chimiques des extraits obtenus révèlent un pH moyen de 5,48 une teneur en sucre estimée par le degré brix entre 15 et 18 % et la conductivité électrique des extraits se situe entre 37,2 et 125,8 S/m.

Les résultats du dosage des composés phénoliques montrent que l'extraction par macération produit une teneur élevée en composés phénoliques totaux (CPT) avec une valeur de 179,11 mg EAG/g MS, tandis que l'extraction par ultrasons à une puissance de 40 % donne un résultat moindre avec une teneur de 152,59 mg EAG/g MS. De même résultats ont été enregistrés pour la teneur en flavonoïdes ou l'extrait MAC est plus riches comparés à ceux obtenus par ultrasons à 60 % (4,09 mg EQ/g MS et 3,55 mg EQ/g MS respectivement). A l'inverse, l'extraction par ultrason manifeste une richesse en tanins comparé aux teneurs de l'extrait par macération (71,43 mg/g MS pour l'extrait US 40 %).

L'évaluation de l'activité antioxydante par le test du piégeage du radical DPPH a révélé que l'extrait US 40 % présente le taux d'inhibition le plus élevé (82,62 %), suivi de l'extrait MAC avec un pourcentage de 78,57 %. Une corrélation élevée a été observée entre la concentration en tanins et l'inhibition du radical DPPH ($R^2 = 0,97$), indiquant que les tanins contribuent de manière significative à l'activité antioxydante des extraits de feuilles de *Psidium guajava* L. Les valeurs des CI50 de l'extrait MAC ont montré un meilleur pouvoir antioxydant comparé aux extraits US avec une valeur de CI50 de 791,5 µg/ml.

En terme de perspective et dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant de :

- ✓ Rechercher la présence de d'autres métabolites secondaires tels que les terpènes et alcaloïdes.
- ✓ Etudier l'activité antioxydante par le biais d'autres tests tels que FRAP, ABTS....
- ✓ Optimiser le ratio et la concentration du solvant.
- ✓ Extraire les principes actifs par d'autres méthodes (assisté par micro-onde, infusion ou décoction)
- ✓ Identifier les composés phénoliques quantifiés par le moyen d'une HPLC.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ❖ **Abidi, L., Snoussi, S. A., & Bradea, M. S. (2017).** Variation du taux de Brix sous l'effet d'un biofertilisant. *79*, 135–144.
- ❖ **Aboulwafa, M. M., Youssef, F. S., Gad, H. A., Sarker, S. D., Nahar, L., Al-Azizi, M. M., & Ashour, M. L. (2019).** Authentication and discrimination of green tea samples using UV–vis, FTIR and HPLC techniques coupled with chemometrics analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *164*, 653–658.
- ❖ **Ademiluyi, A. O., Oboh, G., Ogunsuyi, O. B., & Oloruntoba, F. M. (2016).** A comparative study on antihypertensive and antioxidant properties of phenolic extracts from fruit and leaf of some guava (*Psidium guajava* L.) varieties. *Comparative Clinical Pathology*, *25*(2), 363–374.
- ❖ **AHDA, M., LESTARI, W. T., & RAHAYU, R. L. S. (2019).** Total Phenol Content and Antioxidant activity of Various Concentration of Ethanol Extract of *Psidium Guajava* L. *International Journal of Pharmaceutical Research (09752366)*, *11*(3)
- ❖ **Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021).** Extraction of phenolic compounds: A review. *Current research in food science*, *4*, 200-214.
- ❖ **Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021).** Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, *4*(February), 200–214.
- ❖ **Alimi, H., Hfaiedh, N., Bouoni, Z., Sakly, M., & Ben Rhouma, K. (2011).** Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* flowers extract in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *32*(3), 406–416.
- ❖ **Amaral, V., Alves, T., Souza, J., Batain, F., Crescencio, K., Soeiro, V., de Barros, C., & Chaud, M. (2020).** Phenolic Compounds from *Psidium guajava* (Linn.) Leaves: Effect of the Extraction-Assisted Method Upon Total Phenolics Content and Antioxidant Activity. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *11*, 9346–9357.
- ❖ **Author, I. (2020).** Studies on physical, chemical and mineral evaluation of guava (*Psidium* phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, *117*(1), 1-27.
- ❖ **Babatola, L. J., Oboh, G., & Ademiluyi, A. O. (2019).** Toxicological evaluation of aqueous extract of different varieties of guava (*Psidium guajava* Linn) leaves. *Comparative Clinical Pathology*, *28*, 1689-1697.
- ❖ **Bajić, M., Oberlintner, A., Kőrge, K., Likozar, B., & Novak, U. (2020).** Formulation of active food packaging by design: Linking composition of the film-forming

solution to properties of the chitosan-based film by response surface methodology (RSM) modelling. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 971–978.

❖ **Barbalho, S. M., Farinazzi-Machado, F. M., de Alvares Goulart, R., Brunnati, A. C. S., Otoboni, A. M., & Ottoboni, B. J. M. A. P. (2012).** *Psidium guajava* (Guava): A plant of multipurpose medicinal applications. *Med Aromat Plants*, 1(4), 1-6.

❖ **Belhaj, O., Oumato, J., & Zrira, S. (2015).** Étude physico-chimique de quelques types de miels marocains. *Revue Marocaine Des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 3(3), 71–75.

❖ **Bouchoukh, I., Hazmoune, T., Boudelaa, M., Bensouici, C., & Zellagui, A. (2019).** Anticholinesterase and antioxidant activities of foliar extract from a tropical species: *L.* (Myrtaceae) grown in Algeria. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 32(3), 160-167.

❖ **Braga, T. V., das Dores, R. G. R., Ramos, C. S., Evangelista, F. C. G., da Silva Tinoco, L. M., de Pilla Varotti, F., ... & de Paula Sabino, A. (2014).** Antioxidant, antibacterial and antitumor activity of ethanolic extract of the *Psidium guajava* leaves. *American Journal of Plant Sciences*, 5(23), 3492.

❖ **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.

❖ **Buck, R. P., Rondinini, S., Covington, A. K., Baucke, F. G. K., Brett, C. M. A., Camões, M. F., Milton, M. J. T., Mussini, T., Naumann, R., Pratt, K. W., Spitzer, P., & Wilson, G. S. (2003).** Measurement of pH. Definition, standards, and procedures (IUPAC Recommendations 2002). In *Pure and Applied Chemistry* (Vol. 74, Issue 11, pp. 2169–2200).

❖ **Cacace, J. E., & Mazza, G. (2002).** Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21), 5939-5946.

❖ **Chakraborty, S., Ghosh, U., & Haq, M. B. (2011).** Application of systematic technologies for the extraction of novel phytoconstituents from pharmacologically important plants. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 2(9), 1153.

❖ **Chowdhury, B., Magsi, S. B., Joey Ting, H. N., & Dhar, B. R. (2020).** High-solids anaerobic digestion followed by ultrasonication of digestate and wet-type anaerobic digestion for enhancing methane yield from OFMSW. *Processes*, 8(5).

❖ **Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.

- ❖ **Dakappa, S. S., Adhikari, R., Timilsina, S. S., & Sajjekhan, S. (2013).** A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn.(Myrtaceae). *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 3(2).
- ❖ **Dias, A. L. B., Batista, H. R. F., Sousa, W. C., Bailão, E. F. L. C., Rocha, J. D., Sperandio, E. M., Fernandes, C. C., Souchie, E. L., & Miranda, M. L. D. (2022).** *Psidium myrtilloides* O. Berg fruit and leaves: physicochemical characteristics, antifungal activity and chemical composition of their essential oils in different seasons. *Natural Product Research*, 36(4), 1043–1047.
- ❖ **Díaz-de-Cerio, E., Verardo, V., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2017).** Health effects of *Psidium guajava* L. leaves: an overview of the last decade. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 897
- ❖ **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654–660.
- ❖ **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus. Biologies*, 331(5), 372-379.
- ❖ **Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselsela, H., & Oueld-Mokhtar, S. M. (2015).** Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.
- ❖ **Gutiérrez, R. M. P, Mitchell, S and Solis, R. V 2008. Psidium guajava: a review of its traditional uses** Joseph, B., & Priya, M. (2011). Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of guava (*Psidium guajava* Linn.). *International Journal of pharma and bio sciences*, 2(1), 53-69.
- ❖ **Jang, M., Jeong, S. W., Cho, S. K., Yang, H. J., Yoon, D. S., Kim, J. C., & Park, K. H. (2014).** Improvement in the anti-inflammatory activity of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts through optimization of extraction conditions. *Journal of Functional Foods*, 10, 161-168.
- ❖ **Jang, M., Jeong, S. W., Cho, S. K., Yang, H. J., Yoon, D. S., Kim, J. C., & Park, K. H. (2014).** Improvement in the anti-inflammatory activity of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts through optimization of extraction conditions. *Journal of Functional Foods*, 10, 161–168.
- ❖ **Kumar, M., Tomar, M., Amarowicz, R., Saurabh, V., Nair, M. S., Maheshwari, C & Satankar, V. (2021).** Guava (*Psidium guajava* L.) Leaves: Nutritional Composition, Phytochemical Profile, and Health-Promoting Bioactivities. *Foods*, 2021; 10, 752.

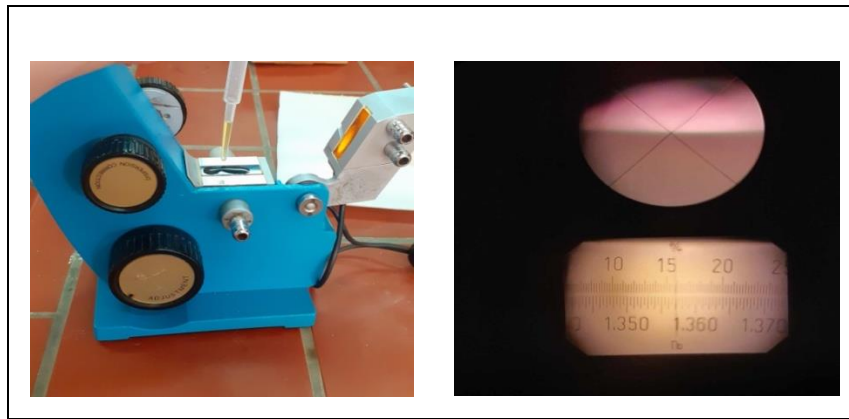
- ❖ **Little, E. L., & Wadsworth, F. H. (1964).** Common trees of Puerto Rico and the Virgin islands (No. 249). US Department of Agriculture, Forest Service.
- ❖ **Mailoa, M. N., Mahendradatta, M., Laga, A., & Djide, N. (2013).** Tannin Extract Of Guava Leaves (*Psidium Guajava L*) Variation With Concentration Organic Solvents. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 2(9), 106–110.
- ❖ **Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. et Kefalas P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89 (3) : p 411-420
- ❖ **Menzel, C. M. (1985).** Guava: An exotic fruit with potential in Queensland. *Queensland Agricultural Journal*, 111(2), 93-98.
- ❖ **Mitra, S. K., Irenaeus, T. K. S., Gurung, M. R., & Pathak, P. K. (2012, April).** Taxonomy and importance of Myrtaceae. In III International Symposium on Guava and other Myrtaceae 959 (pp. 23-34).
- ❖ **Musa, K. H., Abdullah, A., Jusoh, K., & Subramaniam, V. (2011).** Antioxidant Activity of Pink-Flesh Guava (*Psidium guajava L.*): Effect of Extraction Techniques and Solvents. *Food Analytical Methods*, 4(1), 100–107.
- ❖ **N'guessan-Irié, A. G., Kablan, B. J., Siransy-Kouakou, N. G., Konan, A., & Datté, Y. J. (2012).** Propriétés bioactives de l'extrait aqueux des feuilles de *Psidium guajava* (Myrtaceae). *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 16.
- ❖ **Naczka, M., & Shahidi, F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1523-1542.
- ❖ **Nadtochiy, S. M., Stefanos, T., Angona, R. E., Lebedko, N., Baldzizhar, A., Feng, C., & Eaton, M. P. (2022).** Rivaroxaban reduces the dabigatran dose required for anticoagulation during simulated cardiopulmonary bypass. *Anesthesia & Analgesia*, 135(1), 52-59.
- ❖ **Normand F. (2002).** De la fleur au fruit : étude et modélisation de la floraison, de la fécondation-fructification et de la croissance du fruit chez le goyavier-fraise (*Psidium cattleianum*)
- ❖ **Normand, F. (2002).** De la fleur au fruit: étude et modélisation de la floraison, de la fécondation-fructification et de la croissance du fruit chez le goyavier-fraise (*Psidium cattleianum*) (Doctoral dissertation, INA-PG).

- ❖ **Nwozo, S., Awe, S., &Oyinloye, B. (2014).** In vitro antioxidant activity of extracts from leaves of ten commonly used medicinal plants and #8211; a comparative study. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 3(3), 211.
- ❖ **Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., &Oreopoulou, V. (2019).** Extraction of polyphenolsfromaromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. *Polyphenols in plants*, 243-259.
- ❖ **Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., &Simons, A. (2009).**Psidiumguajava. *AgroforestryDatabase: atreereference and selection guide version*, 4.
- ❖ **Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., &Simons, A. (2009).**Psidiumguajava. *AgroforestryDatabase: atreereference and selection guide version*, 4.
- ❖ **Philip Molyneux (2004).** The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 50(June 2003), 211–219.
- ❖ **Pennington, T. D., &Sarukhan, J. (1968).** Field identification manual for the principal tropical trees of Mexico. *Field identification manual for the principal tropical trees of Mexico*.
- ❖ **Pingret, D., Fabiano- Tixier, A. S., &Chemat, F. (2013).** Ultrasound- assisted extraction. 21, 89–112
- ❖ **Puspaningtyas, A. R. (2012).** Evaluation of the effect of red guava (*Psidium guajava*) fruit extract on tyrosinase (EC 1.14. 18.1) activity by spectrophotometry. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(5), 92–97.
- ❖ **Rameshwar Meena, R. M., Waghmare, G. M., & Kamlesh Diwan, K. D. (2014).** Evaluation of white flesh guava (*Psidium guajava* L.) genotypes for growth, yield and quality attributes.
- ❖ **Ravi, K., &Divyashree, P. (2014).** Psidium guajava: A review on itspotential as an adjunct in treatingperiodontaldisease. *Pharmacognosyreviews*, 8(16), 96.
- ❖ **Rodrigues, S., & Fernandes, F. A. N. (2017).**Extraction ProcessesAssisted by Ultrasound. In *EpigeneticBiomarkers and Diagnostics*. Elsevier Inc.
- ❖ **Rutkowska, M., &Namie, J. (2017).**Ultrasound-Assisted Extraction.
- ❖ **Safdar, M. N., Kausar, T., & Nadeem, M. (2017).** Comparison of Ultrasound and Maceration Techniques for the Extraction of Polyphenolsfrom the Mango Peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4).

- ❖ **Selvamuthukumar, M., & Shi, J. (2017).** Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety*, 1(1), 61-81.
- ❖ **Seo, J., Lee, S., Elam, M. L., Johnson, S. A., Kang, J., & Arjmandi, B. H. (2014).** Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. *Food Science & Nutrition*, 2(2), 174–180.
- ❖ **Singh, T. P., Chatli, M. K., & Sahoo, J. (2015).** Development of chitosan based edible films: process optimization using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2530–2543
- ❖ **Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998).** Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4267–4274.
- ❖ **Tabaraki, R., Heidarizadi, E., & Benvidi, A. (2012).** Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punicagranatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 16–23.
- ❖ **Tambun, R., Alexander, V., & Ginting, Y. (2021).** Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from sour sop leaves (*Annonamuricata*): A review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1122(1), 012095.
- ❖ **Tiwari R. K., Mistry N. C., Singh B. (2013).** Indian horticulture database. National Horticulture Board, Min. Agric., Gov. India.
- ❖ **Ugbogu, E. A., Emmanuel, O., Uche, M. E., Dike, E. D., Okoro, B. C., Ibe, C., ... & Ugbogu, O. C. (2022).** The ethnobotanical, phytochemistry and pharmacological activities of *Psidium guajava* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(5), 103759.
- ❖ **Weli, A., Al-Kaabi, A., Al-Sabahi, J., Said, S., Hossain, M. A., & Al-Riyami, S. (2019).** Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Psidium guajava* leaf. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 993-99

Annexes

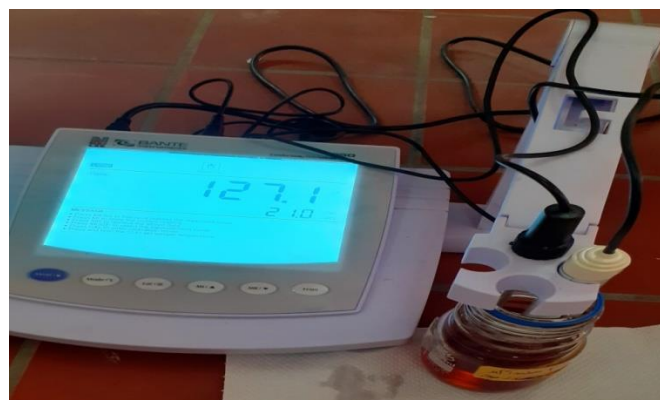
Annexe 01 : La mesure de Brix de l'extrait avec le refractomètre.



Annexe 02 : La mesure de pH de l'extrait avec le pH-mètre.



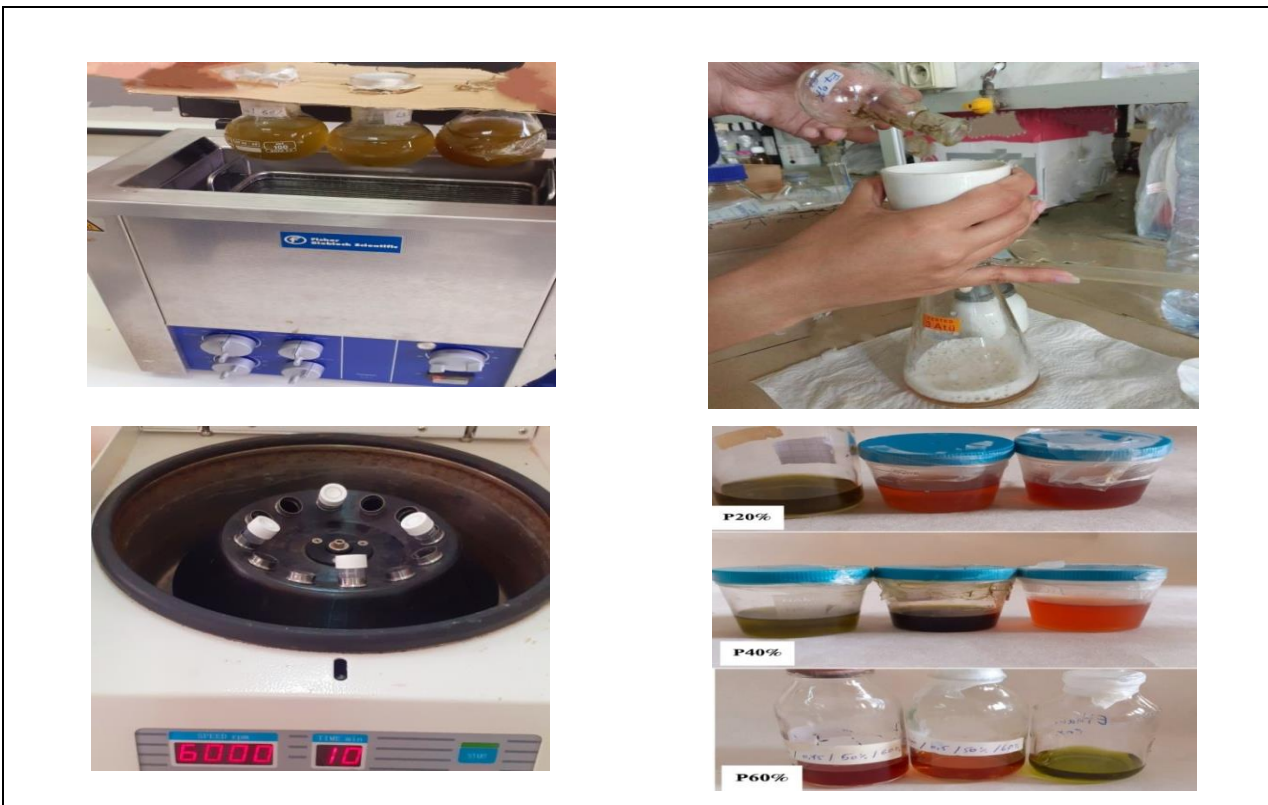
Annexe 03 : La mesure de conductivité de l'extrait avec le conductimètre.



Annexe 04 : Les étapes de l'extraction par macération.



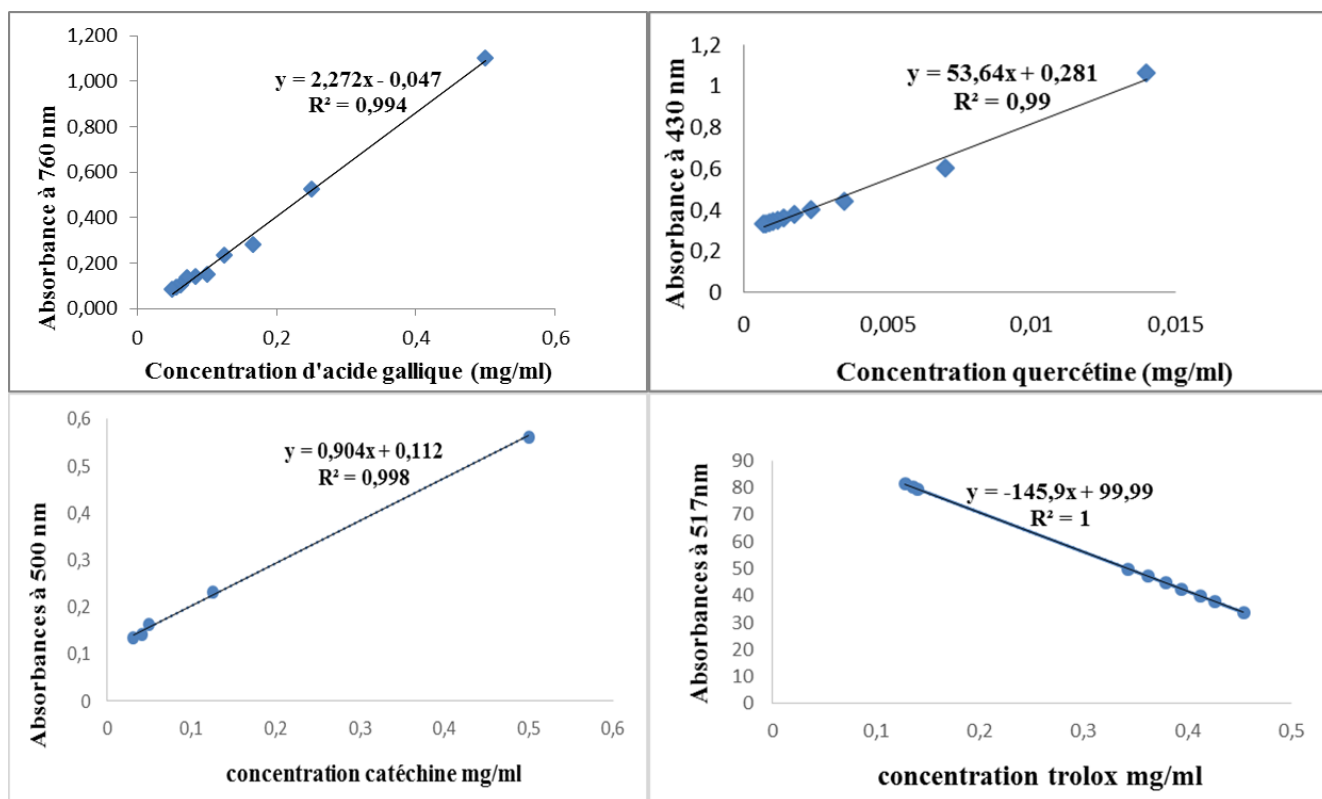
Annexe 05 : Les étapes de l'extraction par ultrason.



Annexe 06 : Les principaux réactifs utilisés ainsi que leurs rôles.

Réactifs	Rôles
Folin-Ciocalteu	Le réactif de Folin-Ciocalteu réagit avec les composés phénoliques pour former un complexe coloré. Ce complexe permet une mesure spectrophotométrique sous-estime des polyphénols totaux présents dans l'échantillon (Libbey et Walradt, 1968)
Carbonate de sodium (NaCO_3)	Dans la méthode Folin-Ciocalteu, le carbonate de sodium neutralise l'acide de Folin, favorisant ainsi la formation de complexes colorés avec les composés phénoliques. De plus, il facilite la réduction des ions, engendrant une coloration bleue caractéristique (Libbey et Walradt, 1968)
Chlorure d'aluminium (AlCl_3)	Le chlorure d'aluminium forme un complexe stable avec les flavonoïdes, facilitant leur quantification par spectrophotométrie en produisant une coloration spécifique mesurable (Kumaran et Joel Karunakaran, 2007) .
DPPH (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle)	Le DPPH est un radical libre stable qui, lorsqu'il est réduit par des antioxydants, perd sa couleur violette. La diminution de la coloration permet d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de feuilles (Brand-Williams et al., 1995)
Vanilline	Ce réactif est spécifique aux tanins condensés et réagit avec eux pour produire une coloration rouge intense. Cette réaction permet de mesurer les tanins par spectrophotométrie (Brand-Williams et al., 1995)
Standards (Acide gallique, Quercétrine, Trolox, Acide ascorbique, Catéchine).	Quantification de la concentration des composés en relation avec la réponse de l'instrument,

Annexe 07 : Les courbes d'étalonnage calculées par loi de Beer-lambert



Annexe 8 : Défaut d'ajustement de l'extraction par macération.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Défaut d'ajustement	3	448,73957	149,580	2,1365
Erreur pure	2	140,02287	70,011	Prob. > F
Erreur totale	5	588,76244		0,3346
				R carré max.
				0,9917

Annexe 9 : Défaut d'ajustement de l'extraction par ultrason.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	
Défaut d'ajustement	3	710,7962	236,932	0,5967	Ultrason 20%
Erreur pure	2	794,1705	397,085	Prob. > F	
Erreur totale	5	1504,9667		0,6754	
				R carré max. 0,9712	

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	
Défaut d'ajustement	3	265,22125	88,407	0,3571	Ultrason 40%
Erreur pure	2	495,16560	247,583	Prob. > F	
Erreur totale	5	760,38685		0,7940	
				R carré max. 0,9739	

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	
Défaut d'ajustement	3	4174,7919	1391,60	2,6418	Ultrason 60%
Erreur pure	2	1053,5378	526,77	Prob. > F	
Erreur totale	5	5228,3297		0,2865	
				R carré max. 0,9768	

Annexe 10 : Corrélation des composés phénoliques dosés des extraits de feuille de *Psidium guajava* avec le pourcentage d'inhibition du DPPH.

Variable	PTC	FLAV	TANNINS	DPPH
PTC	1,00	0,17	0,26	0,36
FLAV	0,17	1,00	-0,68	-0,70
Tannins	0,26	-0,68	1,00	0,97
DPPH	0,36	-0,70	0,97	1,00

Résumé

Résumé

Les plantes médicinales, bien que remplacées par des produits synthétiques, demeurent importantes en médecine grâce à leurs métabolites secondaires comme les polyphénols, présents notamment dans le goyavier (*PsidiumGuajava*) aux propriétés thérapeutiques. Cette étude a pour objectif l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques des feuilles de goyavier et leur dosage et l'évaluation de leur activité antioxydante. Utilisant la Méthodologie de Surface de Réponse (MSR), l'étude compare deux méthodes d'extraction : la macération et les ultrasons. Les conditions optimales révèlent que la macération produit une teneur élevée en composés phénoliques totaux (179,11 mg EAG/g MS) par rapport aux ultrasons à 40% (152,59 mg EAG/g MS). Cependant, l'extraction par ultrasons à 40% présente une teneur plus élevée en tanins (71,43 mg/g MS) et une meilleure activité antioxydante (82,62%) très fortement corrélée avec cette teneur ($R^2=0.97$).

Mots clés : *Psidiumguajava* L, optimisation d'extraction, caractérisation physico-chimique, activité antioxydante, composés phénoliques.

Abstract:

Medicinal plants, although replaced by synthetic products, remain important thanks to their secondary metabolites, such as polyphenols, notably present in guava (*Psidium Guajava*) with therapeutic properties. This study aims to optimize conditions for extracting phenolic compounds from guava leaves, and to assess their antioxidant activity. Using the Response Surface Methodology (RSM), the study compares two extraction methods: maceration and ultrasound. Optimal conditions reveal that maceration produces a high content of high content of total phenolic compounds (179.11 mg EAG/g MS) compared to ultrasound at 40% (152.59 mg EAG/g MS). However, 40% ultrasound extraction has a higher tannin content (71.43 mg/g DM) and better antioxidant activity (82.62%) very strongly correlated with this content ($R^2 = 0.97$).

Key words: *Psidium guajava* L, extraction optimization, physico-chemical characterization, antioxidant activity, phenolic compounds.

ملخص

النباتات الطبية، على الرغم من استبدالها بالمنتجات الاصطناعية، تظل مهمة بفضل مستقلباتها الثانوية، مثل البوليفينول، الموجودة بشكل خاص في الجوافة (بسيديومجواجا) ذات الخصائص العلاجية. تهدف هذه الدراسة إلى تحسين الظروف لاستخلاص المركبات الفينولية من أوراق الجوافة، وتقييم نشاطها المضاد للأكسدة. باستخدام منهجية سطح الاستجابة (RSM)، تقارن الدراسة بين طريقتين للاستخراج: النقع والموجات فوق الصوتية. تكشف الظروف المثالية أن النقع ينتج نسبة عالية من المحتوى العالي من إجمالي المركبات الفينولية (179.11 مجم EAG/g MS) مقارنة بالموجات فوق الصوتية بنسبة 40% (152.59 مجم EAG/g MS). ومع ذلك، فإن الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية بنسبة 40% يحتوي على محتوى أعلى من التانين (71.43 مجم/جم DM) ونشاط أفضل مضاد للأكسدة (82.62%) يرتبط ارتباطاً وثيقاً بهذا المحتوى ($R^2 = 0.97$).

الكلمات المفتاحية: بسيديومجواجا، الاستخلاص الأمثل، التوصيف الفيزيائي والكيميائي، النشاط المضاد للأكسدة، المركبات الفينولية.

