

Activité antioxydante et screening phytochimique de la pulpe de *Psidium guajava* Linn. et de la pelure de *Musa x paradisiaca* L., fruits consommés par les habitants des Hautes Terres de Madagascar

Edouard Ravalison Andrianarison* ; Philippe Antoine Andrianary ;
Oliva Jaconnet Andrianaivoravelona ; Rijalalaina Rakotosaona ; Lala Andrianaivo ;
Navalona Andrianina Ranaivoson et Rovantsoa Jemima Andrianarison.

Laboratoire de Chimie organique du Département Génie Chimique de l'Ecole Supérieure Polytechnique
d'Antananarivo, Madagascar.

*Correspondance courriel : edoravali@yahoo.fr

Résumé

La présente étude a particulièrement pour but de démontrer l'activité antioxydante de la pulpe de fruit de *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) et la pelure de fruit de *Musa x paradisiaca* L. (Musaceae).

La première étape de ce travail consiste à faire le screening phytochimique préliminaire des extraits hydroéthanoliques de ces parties de fruits. En second lieu, les activités antiradicalaires des extraits ont été évaluées selon la méthode au 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyle (DPPH) et leurs pouvoirs antioxydants ont été comparés à celui de l'acide ascorbique, antioxydant de référence par la valeur de concentration inhibitrice IC₅₀. Les familles chimiques des substances responsables des activités antioxydantes sont finalement déterminées par la méthode « bioautography ».

Nos résultats ont permis de trouver que la pelure de *Musa x paradisiaca* (Musaceae), avec sa valeur de concentration inhibitrice IC₅₀ de 2,04µg/ml, détient un fort pouvoir antioxydant excédant même celui de l'acide ascorbique (IC₅₀ = 2,05 µg/ml). La pulpe de fruit de *Psidium guajava* (Myrtaceae) a montré une concentration IC₅₀ de 14,97µg/ml. Les résultats obtenus dans le screening phytochimique démontrent que ces produits naturels sont particulièrement intéressants par leurs forts pouvoirs antioxydants dus à leur richesse en substances antioxydantes. Leur consommation pourra alors contribuer à limiter le dommage oxydatif dans l'organisme humain.

Mots-clés : *Musa x paradisiaca*, *Psidium guajava*, screening phytochimique, activité antioxydante, DPPH, CCM, méthode « bioautography ».

Abstract

The present study was particularly intended to demonstrate the antioxidant activity of the fruit pulp of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) and the fruit peel of *Musa x paradisiaca* L. (Musaceae).

The first step of this work is to make the preliminary phytochemical screening of the hydroethanolic extracts of these parties of fruit. In the second place, the antiradical activities of these extracts have been evaluated according to the method in 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyle (DPPH) and their antioxidant powers have been compared to the reference antioxidant inhibitory concentration IC₅₀ value of the ascorbic acid. The chemical families of substances responsible for antioxidant activities are finally determined by the method "bioautography".

Our results have allowed us to find that the fruit peel of *Musa x paradisiaca* (Musaceae) holds a strong antioxidant power with its inhibitory concentration value IC₅₀ of 2.04µg/mL, exceeding even that of the ascorbic acid (IC₅₀=2.05µg/mL). The fruit pulp of *Psidium guajava* (Myrtaceae) showed a concentration IC₅₀ value of 14.97µg/mL. The results obtained in the phytochemical screening showed that these natural products are particularly interesting by their strong powers antioxidants due to their richness in antioxidant substances. Their consumption may help limit oxidative damage in the human body.

Keywords: *Musa x paradisiaca*, *Psidium guajava*, phytochemical screening, antioxidant activity, DPPH, TLC, bioautography method.

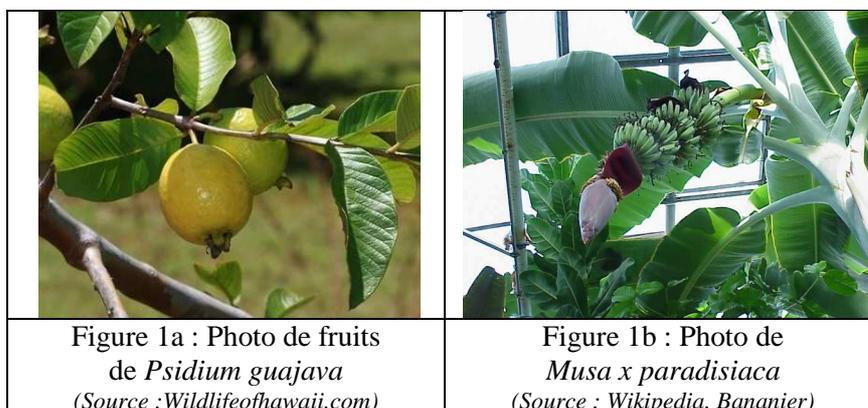
1. INTRODUCTION

Le monde des sciences biologiques et médicales est dominé récemment par le concept de stress oxydatif. Dans cette situation, la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques à l'origine de nombreuses maladies (Defraigne, 2007). Le paradoxe de l'oxygène survient. En effet, le dioxygène O₂, molécule indispensable à la vie, en condition physiologique, produit en permanence des espèces réactives de l'oxygène ERO (angl. ROS ou Reactive Oxygenated Species) au niveau de la mitochondrie et ces espèces deviennent dangereuses à l'organisme humain lorsqu'elles sont formées en excès (Barouki, 2006). Ces ERO, dont font partie les radicaux libres oxygénés, sont particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire (Favier, 2003) (Roussel, 2002). En outre, l'accroissement de la pollution environnementale a entraîné l'augmentation du taux des ERO dans le corps de l'homme. Par leur propriété oxydante, les ERO réagissent dans l'organisme humain avec les nombreux substrats biologiques comme les lipides, protéines, ADN, glucose, etc. et enclenchent des maladies dégénératives associées à ce phénomène de stress oxydatif.

Dans ce travail, nous démontrons que les produits naturels, consommés par l'homme comme les fruits, peuvent apporter des substances antioxydantes ayant la capacité de piéger ces radicaux libres très réactifs, permettent le contrôle du niveau des ERO et minimisent le dommage oxydatif présent dans l'organisme humain en inhibant l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ERO. L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les substances naturelles à activité antioxydante contribuent au piégeage des métaux de transition toxiques à l'organisme humain (Fiorrucci, 2006) (Benbrinis, 2012). Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques (Benbrook, 2005) (Popovici, 2009).

La banane appelée « akondro », « akatakata » ou « kida », est le fruit du bananier domestique (Figure 1b) dont le nom scientifique est *Musa x paradisiaca* L., de la famille des Musaceae, dont l'origine se situe entre l'Inde et les îles mélanésiennes du Pacifique, largement cultivée dans toutes les régions tropicales de la planète notamment à Madagascar (Nelson, 2006). La banane dit « akondro », est un fruit essentiel comestible et consommé par la plupart de la population comme les habitants des Hautes Terres de Madagascar. C'est un fruit annuel rencontré dans toutes les régions de notre Ile. Cependant sa pelure, objet de cette étude d'activité antioxydante, a toujours été rejetée par son goût astringent désagréable. Comme usages traditionnels de la banane et des parties du bananier, on connaît ses qualités à guérir l'incontinence des enfants, les maladies gastriques, les plaies infectées, les verrues, comme agent antihémorragique et cicatrisant lors des circoncisions (Descheemacker, 1979).

La goyave à chair rose appelée « goavy », est le fruit du goyavier (Figure 1a) de nom scientifique *Psidium guajava* Linn., de la famille des Myrtaceae, arbre fruitier d'origine néotropicale, très commun dans toute la zone intertropicale (Vasquez, 2002). Le goyavier est répandu notamment dans les régions des Hauts Plateaux la Grande Ile aux abords des routes et des villages. D'une saveur agréable, la goyave est un fruit très apprécié par la population autochtone. Cependant, loin des consommateurs, il est laissé pourrir dans les champs. La goyave est un remède naturel contre les diarrhées, le diabète, et les risques de cancer (Descheemacker, 1979) (Rishika, 2012).



Une des qualités biologiques d'un fruit ou d'autres produits naturels est appréciée par son potentiel antioxydant lié aux substances bioactives naturelles. La mesure de l'activité antiradicalaire permet, par détermination graphique, d'évaluer le pouvoir antioxydant de la partie étudiée d'un fruit par la valeur de sa concentration inhibitrice IC₅₀ (en µg/mL) réduisant à 50% la concentration de la solution méthanolique de DPPH (2,2-diphénylpicryl-1-hydrazyle) servant à l'analyse. La famille chimique des métabolites secondaires responsables d'activité antiradicalaire est ensuite identifiée par la méthode « bioautography » au DPPH.

L'objectif principal de ce travail est de démontrer les intérêts portés à la consommation de fruits, produits naturels apportant des substances antioxydantes dans l'organisme humain afin de limiter les dommages causés par le stress oxydatif et d'éviter l'apparition précoce de diverses maladies notamment les maladies cardiovasculaires, les maladies dégénératives comme le cancer, le diabète et les maladies associées au processus de vieillissement de l'organisme humain comme l'alzheimer et la maladie de Parkinson.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Cueillette : Les fruits de *Psidium guajava* Linn. et de *Musa x paradisiaca* L. ayant servi à nos études ont été sélectionnés dans des achats réalisés au marché de Mahamasina Antananarivo au mois d'Avril 2015 et triés afin d'éliminer les fruits pourris.

2.2. Extraction : La pulpe de fruit de *Psidium guajava* et la pelure de fruit de *Musa x paradisiaca* sont d'abord enlevées, séparées, découpées et séchées à l'ombre pendant 7 jours puis à l'étuve maintenue entre 40 à 45°C durant 24 heures de manière à réduire au maximum leur taux d'humidité. Elles sont ensuite soumises au hachage au moyen d'un broyeur à couteau puis sassées sur tamis ASTM à des granulométries inférieures à 2 mm. Les broyats obtenus sont ensuite conservés à l'abri de la lumière dans des emballages étanches en plastique jusqu'à leur utilisation. Le matériel végétal sec de masse bien définie a été extrait par trois macérations successives de 48 heures au mélange hydroéthanolique éthanol/eau 90/10 (v/v) dans un erlenmeyer et sous agitation magnétique continue. Après filtration sur Büchner, l'évaporation sous pression réduite au rotavapor de marque Buchi permet de recueillir l'extrait brut éthanolique sec EE. Ce dernier subit les étapes d'extraction en cascade par partage liquide-liquide avec l'eau et trois solvants organiques à polarité croissante : hexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle. Les extraits organiques obtenus sont soumis à la dessiccation au sulfate de sodium anhydre puis l'évaporation de solvant conduit aux résidus secs successifs à l'hexane EEH, au dichlorométhane EED et à l'acétate d'éthyle EEA conservés à 5°C dans des flacons de couleur sombre, au réfrigérateur à l'abri de la lumière.

2.3. Screening phytochimique

La présence de famille chimique de substances naturelles dans le matériel végétal étudié est réalisée par screening phytochimique de son extrait.

2.3.1. Alcaloïdes : A 500 mg d'extrait hydroéthanolique sec sont ajoutés 10 mL de HCl 2N aqueux. Le mélange est ensuite porté au bain marie bouillant pendant 5 mn tout en agitant avec une baguette de verre. Après refroidissement, on y ajoute 500mg de NaCl. Le mélange est alors agité puis filtré sur papier Whatman. Le volume du filtrat est ensuite ramené à 10mL par addition de HCl 2N puis réparti dans quatre tubes à essai dont l'un servira de témoin et les trois autres sont testés respectivement par addition de 5 gouttes de réactif d'alcaloïde (Ranarivelo, 2004). La réalisation de trois tests au minimum est nécessaire pour pouvoir affirmer la présence d'alcaloïdes dans le matériel végétal testé et éviter des réactions faussement positives (Bruneton, 1999) (Luhata, 2008).

- *Test au réactif de Mayer* : la présence d'alcaloïde est indiquée par l'apparition de flocon de précipité blanc lors de l'addition de tétraiodomercurate de potassium (solution mélange de HgCl₂ et de KI) dans l'extrait acide.
 - *Test au réactif de Wagner* : la présence d'alcaloïde se révèle à l'apparition de précipité rouge orangé lors de l'addition de réactif iodo-ioduré (solution mélange de I₂ et de KI) dans l'extrait analysé.
 - *Test au réactif de Dragendorff* : la présence d'alcaloïde est révélée par l'apparition de précipité orange lors de l'addition de tétraiodobismuthate de potassium (solution mélange de sous-nitrate de bismuth et de KI) dans l'extrait testé.
- 2.3.2.** *Flavonoïdes* : 200 mg d'extrait organique sont dissouts dans 10 mL d'éthanol à 80%. Après filtration, 1 mL de cette solution hydroéthanolique est additionné de 0,5 mL de HCl concentré et de quelques grains de tournures de magnésium. Après 10 min, l'apparition d'une coloration rouge indique la présence de flavonoïdes (Ranarivelo, 2004).
- 2.3.3.** *Anthocyanes* : A 2 mL de solution éthanolique d'extrait, on ajoute 2 mL de solution d'acide chlorhydrique à 25%. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition de solution d'ammoniaque à 25% indique la *présence d'anthocyanes* (Gurib-Fakim, 1997).
- 2.3.4.** *Leucoanthocyanes* : A 2 mL de solution éthanolique d'extrait sont additionnés 2 mL de HCl concentré. Le mélange est placé au bain marie bouillant pendant une vingtaine de minutes. L'apparition d'une coloration rouge démontre la présence de leucoanthocyanes (Gurib-Fakim, 1997).
- 2.3.5.** *Tanins et autres composés phénoliques* : L'extrait organique de masse 100mg est dissout dans 25mL d'eau distillée bouillante puis additionné de quatre gouttes de solution aqueuse de NaCl à 10%. La solution ainsi obtenue est filtrée sur papier Whatman. Le filtrat refroidi est alors réparti dans quatre tubes à essai, le 4^{ème} tube servant de témoin (Ranarivelo, 2004) (Rizk, 1982).
- Tube n°1: addition de cinq gouttes de gélatine à 1%. L'apparition d'un précipité éventuel indique la présence de polyphénols.
 - Tube n°2: addition de cinq gouttes de gélatine salée (mélange volume à volume de gélatine à 1% et de solution NaCl à 10%). L'apparition d'une précipitation par la gélatine salée signifie la présence de tanins.
 - Tube n°3: addition de cinq gouttes de FeCl₃ dilué à 1% dans le méthanol.
 - La *présence de tanins galliques et ellagiques* (tanins hydrolysables) est indiquée par l'apparition d'une coloration bleue noire.
 - La *présence de tanins catéchiques* (tanins condensés) s'observe par l'apparition d'une coloration brune verdâtre.
 - Une réaction négative à la gélatine salée accompagnée d'une coloration verte ou bleue noire avec FeCl₃, est due à la présence d'autres types de composés phénoliques.
- 2.3.6.** *Coumarines* : Le test de détection des coumarines est basé sur leur propriété à présenter une fluorescence nette aux rayons UV. A 200 mg d'extrait EE, on ajoute 10 mL d'eau distillée. Après dissolution et filtration, à 5 mL du filtrat est additionnée goutte à goutte une solution aqueuse de soude à 20 %, puis on la chauffe au bain marie bouillant pendant quelques minutes. Le mélange est ensuite observé sous rayonnement UV 365 nm : une fluorescence nette (jaune, vert, bleu, orange) sous UV 365nm indique la présence des coumarines (méthode indicative et non une identification) (Rizk, 1982) (Bruneton, 1999).

- 2.3.7. Triterpènes et stéroïdes :** Prendre 500mg de l'extrait hydroalcoolique dépigmenté ou d'extrait organique et y ajouter 20 mL de dichlorométhane puis agiter pendant 5 à 10 min. Laisser décanter puis sécher la solution avec Na₂SO₄ anhydre. Filtrer et répartir le filtrat dans 5 tubes à essais propres et secs ; le tube n°5 servira de témoin (Ranarivelo, 2004) (Bolivar, 2011).
- 2.3.7.1. *Test de Liebermann Burchard :* Dans le 1^{er} tube, additionner 4 gouttes d'anhydride acétique et 4 gouttes d'acide sulfurique concentré. La présence des composés chimiques est indiquée par la coloration observée suivante :
- pourpre : présence de triterpènes ;
 - violet ou bleu-vert : présence de stéroïdes.
- 2.3.7.2. *Test de Salkowski :* Incliner le tube à 45° puis ajouter 1mL d'acide sulfurique concentré. Après 30mn, la présence de stérols insaturés est indiquée par l'apparition d'un anneau de séparation des phases de couleur rouge.
- 2.3.7.3. *Test de Badjet Kedde :* Additionner quelques grains d'acide picrique à la solution. L'observation d'une coloration rouge dénote la présence de stéroïdes lactoniques.
- 2.3.7.4. *Test de Keller-Killiani :* Incliner le tube de 45° et additionner quelques gouttes de FeCl₃ à 10% dans le méthanol et quelques gouttes d'acide acétique glacial. La présence d'un anneau de séparation de phase de couleur rouge pourpre indique la présence de désoxy-2-sucres.
- 2.3.8. *Quinones :* 200 mg d'extrait organique sont dissous dans de l'eau distillée, puis filtrés. Le filtrat est extrait deux fois au benzène. A 10 mL d'extrait benzénique sont ajoutées 5 mL de solution aqueuse d'ammoniaque NH₄OH à 20 %, puis le mélange est agité. Après décantation, une coloration rouge orangée ou rouge violacée de la phase ammoniacale indique un test positif (Bruneton, 1999) (Dohou, 2003) (Alilou, 2014).
- 2.3.9. *Saponines (test de mousse) :* Une masse de 2 g de matériel végétal sec ou son équivalent en extrait brut est agitée vigoureusement pendant 30 secondes avec 20mL d'eau distillée dans un tube à essai. Le tube est ensuite disposé verticalement. Après 10 mn de repos, une hauteur de la mousse persistante, supérieure ou égale à 3 cm, indique la présence de saponines (Ranarivelo, 2004).
- 2.3.10. *Composés cyanogénétiques :* Dans un tube à essai, humecter 2g de matériel végétal sec avec une quantité suffisante d'eau puis ajouter 1 mL de CHCl₃. Insérer ensuite une bandelette de papier filtre Whatman imprégnée de solution fraîchement préparée de picrate de sodium (5g de Na₂CO₃ + 0,5g d'acide picrique + 100mL d'eau distillée) juste au-dessus de la drogue et plier sur le bord du tube à essai. Boucher le tube avec du coton hydrophile et chauffer à 35°C au bain marie pendant 3 heures. La présence des composés cyanogénétiques est indiqué par le virage de la coloration du papier picrossodé au rouge orangé par production de HCN (Dohou, 2003) (Alilou, 2014).

2.4. Activité antioxydante

Une analyse par chromatographie sur couche mince préliminaire révélée au DPPH permet d'avoir une approche qualitative de l'activité antiradicalaire des différents extraits de fruits étudiés. La méthode quantitative de mesure de l'activité antiradicalaire permettra de déduire la concentration inhibitrice IC₅₀ de ces extraits.

2.4.1. Mesure de l'activité antiradicaire par méthode spectrométrique au DPPH

Le 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH est un radical libre qui présente une bande d'absorption caractéristique à 517 nm liée à la résonance des électrons non appariés. En présence d'une

substance chimique antioxydante dans l'échantillon analysé, le DPPH est réduit et change de couleur du violet au jaune clair. La mesure de l'absorbance A des échantillons testés sur le spectromètre UV-Visible de marque PERKIN ELMER à la longueur d'onde 517 nm permet de mesurer l'intensité de la décoloration des solutions. La concentration inhibitrice IC50 de l'extrait étudié, concentration correspondant à la réduction de 50% de l'absorbance initiale du blanc B, est alors déterminée sur le graphe représentant la courbe d'inhibition (courbe d'activité antiradicalaire en fonction de la concentration de solution d'extrait testé). L'activité antioxydante de la solution étudiée est ensuite comparée à celle de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) (Brand-Williams, 1995) (Singh, 2011). Le spectromètre est initialement calibré à 0 avec le méthanol comme solution étalon E.

La méthode au DPPH de PAJERO et al. (Codina, 2000), légèrement modifiée, décrite par (Kgatle, 2007) puis (Bidié, 2011), a été adoptée pour mesurer l'activité antiradicalaire de l'extrait testé. Une gamme de concentrations allant de 0 à 80 µg/mL d'extrait de matériel végétal ou d'acide ascorbique est préparée dans le méthanol. Un volume de 2,5 mL de cette solution est mélangé à 2,5 mL de solution 100 µM de DPPH préparé également dans le méthanol. Après homogénéisation, le mélange est incubé à la température ambiante (25°C) dans le noir, à l'abri de la lumière. Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance de l'échantillon testé est lue à 517 nm contre celle d'un blanc qui ne contient que la solution méthanolique de DPPH.

L'activité antiradicalaire AAR (%) de l'échantillon testé correspondant au pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR (\%)} = \frac{A_0(\text{Absorbance du blanc}) - A(\text{Absorbance de l'échantillon})}{A_0(\text{Absorbance du blanc})} \times 100$$

L'absorbance du blanc A_0 correspond à l'absorbance maximale obtenu avec la solution 100 µM de DPPH (40mg/L).

La concentration inhibitrice IC50 (µg/mL), concentration d'extrait de plante ou de l'antioxydant de référence responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, permet d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait analysé.

Les valeurs de concentration inhibitrice IC50 des extraits de *E. jambolana* et de l'acide ascorbique, sont déterminées par extrapolation sur les courbes de tendance « y » les plus proches des graphes d'activité antiradicalaire en fonction des concentrations d'extrait analysé ou de l'antioxydant de référence, avec un coefficient de détermination de R^2 . La valeur d'AAR, telle que $y = 50\%$, correspond à la concentration inhibitrice IC50 de l'extrait étudié (Nouioua, 2012).

2.4.2.Méthode « bioautography »

L'identification qualitative *in situ* des substances à activité antioxydante est réalisée selon la méthode « bioautography » (Gangopadhyay, 2015) par chromatographie sur couche mince où l'activité antioxydante est révélée au DPPH, selon (Takao, 1994). Cette CCM est effectuée sur plaque chromatographique à gel de silice 60F254 sur support en feuille d'aluminium 20cm x 20cm de marque Merck. Les chromatogrammes obtenus sont alors révélés par pulvérisation de solution méthanolique de DPPH à 2 mg/ml. Après séchage et incubation de 30 minutes à l'air libre, les taches de migration relatives aux substances à activité antioxydante apparaissent en jaune-clair sur fond violet. L'intensité de coloration des taches indique l'activité antioxydante de l'extrait et de la substance éluee.

La comparaison des taches de migration d'autres plaques, migrées dans les mêmes conditions chromatographiques, révélées avec les réactifs spécifiques permet de connaître qualitativement les familles phytochimiques d'appartenance de métabolites secondaires responsables d'activité antioxydante (Grzelak, 2011) :

- terpénoïdes et stéroïdes : réactif de Liebermann Burchard,
- flavonoïdes : réactif de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$,
- coumarines : vapeur d'ammoniaque NH_3 ,
- composés phénoliques : réactif de chlorure ferrique $FeCl_3$.
- alcaloïdes : réactif de Dragendorff.

L'élution a été menée avec le système éluant de développement toluène/acétate d'éthyle/méthanol - 2:6:2 (v/v/v).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Rendement d'extraction

Les résultats d'extraction hydroéthanolique des parties étudiées des fruits concernés sont récapitulés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Tableau montrant le rendement des extractions hydroéthanoliques

Partie du fruit étudiée	Volume de solvant d'extraction (ml)	Masse initiale (g)	Masse de l'extrait (g)	Rendement d'extraction (%)
Pulpe de <i>P. guajava</i>	200	10,590	4,026	38,02
Pelure de <i>M. paradisiaca</i>	200	10,273	3,128	30,45

Les rendements d'extraction hydroéthanolique des parties de fruits étudiées sont tous assez élevés. Ce fait s'explique la présence majoritaire de substances osidiques dans les fruits.

3.2. Criblage phytochimique

Le tableau 2 récapitule les résultats des screening phytochimiques effectuées. Les notations suivantes ont été adoptées pour les appréciations de présence de substances chimiques lors des criblages phytochimiques :

Tableau 2 : Récapitulation des résultats du screening phytochimique des parties de fruits étudiées

	Pulpe de <i>P. guajava</i>	Pelure de <i>M. paradisiaca</i>
Coumarines	-	+++
Flavonoïdes	-	+++
Anthocyanes	-	-
Leucoanthocyanes	+++	+++
Tanins condensés	+	-
Tanins hydrolysables	-	+++
Composés phénoliques	+	+++
Quinones	-	+
Stérols insaturés	+++	+++
Stéroïdes lactoniques	+++	+++
Triterpènes	+++	-
Stéroïdes	++	+
Cardénolides	+++	+++
Iridoïdes	+	-
Saponines	-	-
Hétérosides désoxy-2-sucres	-	-
Alcaloïdes	-	+
Hétérosides cyanogènes	-	-

Test négatif (-) ; Faible présence (+) ; Présence moyenne (++) ; Présence abondante (+++).

Selon les résultats du tableau 2, la pulpe de *P. guajava* et la pelure de *M. paradisiaca* sont riches en variétés de métabolites secondaires. La pulpe de goyave renferme des leucoanthocyanes, des stérols insaturés, des stérols lactoniques, des triterpènes, des stéroïdes, des tanins, des cardénolides et

d'autres composés phénoliques. L'extrait hydroéthanolique de pelure de banane est marqué par la présence de coumarines, de flavonoïdes, de leucoanthocyanes, de tanins hydrolysables, stérols insaturés, des stérols lactoniques, des cardénolides, des dérivés quinoniques, des alcaloïdes et d'autres composés phénoliques. Tous ces métabolites secondaires sont responsables de nombreuses activités biologiques et la richesse de ces parties étudiées de fruits en ces substances montre leurs intérêts pharmacologiques, en particulier leur activité antioxydante. Ces résultats vont permettre d'interpréter par la suite les CCM de screening phytochimique des extraits à activité antioxydante par la méthode « bioautography ».

3.3. Activité antioxydante

Les intensités et les traînées de taches observées sur la CCM de « bioautography » préliminaire d'activité antioxydante des extraits hydroéthanoliques révélée *in situ* au DPPH, par migration réalisée avec le système éluant de développement toluène/acétate d'éthyle/méthanol (2:6:2) (v/v/v), démontrent selon le tableau 3 que la pulpe de *P. guajava* et la pelure de *M. paradisiaca* disposent de nombreuses substances naturelles à activité antioxydante.

Tableau 3 : Résultats des CCM préliminaires d'activité antioxydante par révélation au DPPH

Partie du fruit	Nombre de spots jaunes	Activité antioxydante
Pulpe de <i>P. guajava</i>	2 et traînée	++
Pelure de <i>M. paradisiaca</i>	3 et traînée	+++

Activité moyenne (++) ; Forte activité (+++)

3.3.1. Mesure de l'activité antiradicalaire

Les résultats de mesure d'absorbance après incubation de 30 minutes des mélanges de solution méthanolique d'extrait de matériel végétal ou d'antioxydant de référence avec la solution 100 µM de DPPH sont donnés dans les tableaux ci-dessous.

Le tableau 4 donne les résultats d'évaluation de l'AAR de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) et les résultats de mesure de l'AAR des extraits hydroéthanoliques de pulpe de *P. guajava* et de pelure de *M. paradisiaca* sont indiqués dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 4 : Mesure de l'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique

solution	E	B	AA1	AA2	AA3	AA4	AA5	AA6	AA7	AA8
concentration(µg/ml)	0	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80
Absorbance A	0,000	0,625	0,377	0,331	0,307	0,266	0,201	0,136	0,056	0,016
AAR(%)	0,00	0,00	39,66	47,01	50,89	57,50	67,89	78,28	91,08	97,38

Tableau 5 : Mesure de l'activité antiradicalaire de pulpe de *P. guajava*

solution	E	B	PG1	PG2	PG3	PG4	PG5	PG6	PG7	PG8
concentration(µg/ml)	0	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80
Absorbance A		0,625	0,509	0,409	0,378	0,348	0,318	0,303	0,287	0,286
AAR(%)	0,00	0,00	18,49	34,61	39,44	44,28	49,11	51,47	54,13	54,30

Tableau 6 : Mesure de l'activité antiradicalaire de pelure de *M. paradisiaca*

solution	E	B	MP1	MP2	MP3	MP4	MP5	MP6	MP7	MP8
concentration (µg/ml)	0	0	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40	80
Absorbance A		0,629	0,484	0,367	0,294	0,265	0,206	0,118	0,090	0,054
AAR(%)	0,00	0,00	23,01	41,64	53,28	57,94	67,26	81,23	85,64	91,46

Les graphes correspondant aux courbes d'activité antiradicalaires des extraits et de l'acide ascorbique sont tracés dans la figure 2. Les courbes de tendances ont uniquement été tracées pour quatre points expérimentaux situés autour de la valeur AAR de 50%.

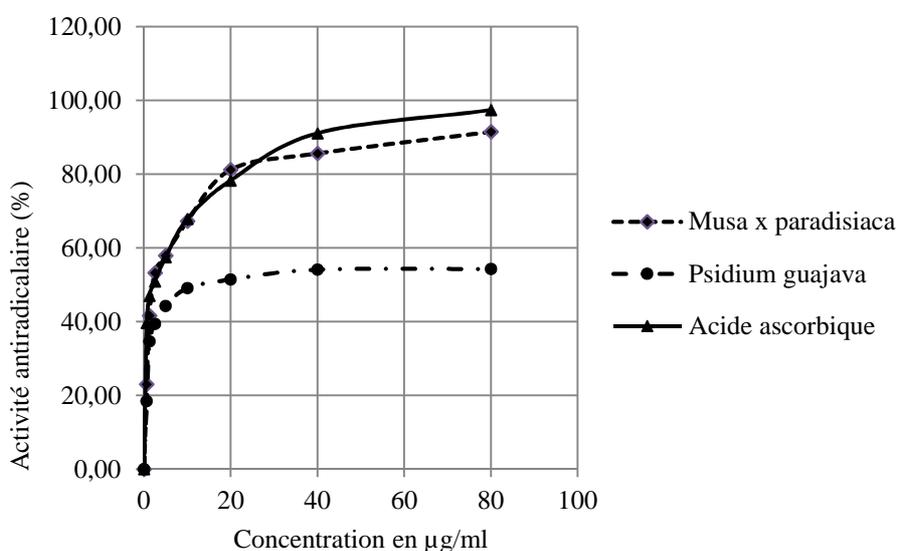


Figure 2 : courbes des activités antiradicalaires de pulpe de *P. guajava* et de pelure de *M. paradisiaca*

Le tableau 7 donne les valeurs de concentration inhibitrice IC50 des extraits et de l'acide ascorbique, trouvées après extrapolation sur les courbes de tendance « y » des graphes d'activité antiradicalaire en fonction des concentrations d'extrait analysé. En effet, pour la valeur $y = 50\%$ d'AAR, on déduit la valeur « x » relative à la concentration IC50 de l'extrait correspondant.

Tableau 7 : Valeurs estimées des concentrations inhibitrices IC50

	Equation de la courbe de tendance adoptée	Concentration IC50 (µg/mL)	Coefficient de détermination R ²
Acide ascorbique	$y = 8,281 \cdot \ln(x) + 44,047$	2,05	0,987
<i>P. guajava</i> /pulpe	$y = 4,601 \cdot \ln(x) + 37,550$	14,97	0,970
<i>M. paradisiaca</i> /pelure	$y = -3,429x^2 + 26,72x + 9,811$	2,04	0,968

D'après ces résultats, la pelure de *Musa x paradisiaca* étudiée possède une concentration inhibitrice IC50 de 2,04µg/mL comparable à celle de l'acide ascorbique, antioxydant de référence, dont l'IC50 est de 2,05µg/mL dans les mêmes conditions expérimentales. Ce résultat confirme que la pelure de *Musa x paradisiaca* est très riche en substances à activité antioxydante. La pulpe de fruit de *Psidium guajava* avec sa concentration IC50 de 14,97µg/mL détient aussi d'un fort pouvoir antioxydant mais à un degré plus faible comparé à celui de l'acide ascorbique.

La comparaison des résultats de CCM de « bioautography » au DPPH résumé au tableau 3 avec les valeurs trouvées de concentration inhibitrice IC50 nous permet de confirmer les forts potentiels antioxydants dont disposent la pelure de *Musa x paradisiaca* et la pulpe de fruit de *Psidium guajava*.

3.3.2. CCM de screening phytochimique

Le screening phytochimique des substances à activité antioxydante a été réalisé par CCM de « bioautography » *in situ* au DPPH. Les taches de migration de chromatoplaques révélées au DPPH sont comparées avec les taches migration de chromatoplaques pulvérisées de différents réactifs spécifiques d'identification indiqués au sous-paragraphe 2.4.2 après élution au système de solvant toluène/acétate d'éthyle/méthanol - 2:6:2 (v/v/v).

La confrontation des résultats de ce screening phytochimique par « bioaography » avec les résultats de screening phytochimique préliminaire du sous-paragraphe 3.2 résumé par le tableau 3 permet de dire que les substances naturelles responsables d'activité antioxydante de la pelure de *Musa x paradisiaca* sont des composés polaires comme les flavonoïdes, des stéroïdes, des terpénoïdes, des tanins hydrolysables et d'autres composés phénoliques. L'activité antioxydante de la pulpe de fruit de *Psidium guajava* provient de leucoanthocyanes, de tanins condensés, des stéroïdes, des terpénoïdes et d'autres substances polaires comme les acides organiques naturels, lui attribuant la saveur acide, et n'ayant pas migré lors des CCM de screening phytochimique. Ces substances sont toutes dotées de propriété antioxydante en bloquant la formation de radicaux libres ERO ou par chélation des métaux lourds toxiques à l'organisme humain (Fiorrucci, 2006) (Benbrinis, 2012). En effet, les composés phénoliques à fort pouvoir antioxydant comme les flavonoïdes, les polyphénols, les tanins condensés ou hydrolysables retardent l'apparition de maladies cardiovasculaires, du cancer, du diabète, de maladies dégénératives associées au vieillissement (Imam, 2011), à guérir les verrues (Streit, 2014).

Particulièrement, dans l'optique de proposer aux Malgaches un meilleur état de santé de notre corps, la forte activité antioxydante de pelure de banane nous incite à trouver une valorisation valable de ce résidu organique habituellement jeté à la poubelle, dans le domaine phyto-médicamentaire. En réalité, en Afrique, beaucoup de tribus autochtones sont connus pour consommer ensemble la banane mûre et sa pelure dans certaines régions du monde. Dans la société asiatique, depuis les temps anciens, les gens font frire les peaux de bananes mûres ou crues comme croustillant riche en antioxydant (Lancoméga, 2014).

A Madagascar, parmi les usages traditionnels de la pelure de banane, on connaît ses qualités pour guérir les plaies infectées, à guérir les verrues, comme agent antihémorragique et cicatrisant lors de la circoncision (Descheemacker, 1979). Ces vertus sont tous associées à la propriété antioxydante apportée par les substances naturelles incluses dans la pelure de banane.

4. CONCLUSION

La pelure de *Musa x paradisiaca* et la pulpe de *Psidium guajava* sont des produits naturels dotée d'importante activité antioxydante par leur richesse en substances biologiques comme les flavonoïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et d'autres composés phénoliques. Dans ce travail, nous avons suscité les intérêts dans la valorisation médicinale de la pelure de banane, sous-produit agroalimentaire souvent jeté dans les poubelles et de la goyave souvent laissée à pourrir dans les champs comme produits alimentaires riches en substances antioxydantes. La consommation de ces produits naturels contribue à limiter le dommage oxydatif au sein de notre organisme humain, empêcher l'apparition précoce de nombreuses maladies cardio-vasculaires, du cancer, du diabète et limiter l'apparition de nombreuses maladies dégénératives associées au vieillissement.

BIBLIOGRAPHIE

Alilou, H., Hassani L. M. I., Barka N., Bencharki B., 2014. Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*, Afrique Science 10(3) 316 - 328.

Barouki, R., 2006. Stress oxydant et vieillissement, Médecine/Sciences ; 22 : 266-72.

Benbrinis, S., 2012. Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*. Mémoire présenté pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biochimie, Option: Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas-Setif.

Benbrook, C., 2005. Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques, The Organic center for Education and promotion.

Bidié, A. P., N'Guessan B. B., Yapo A. F., N'Guessan J. D., Djaman A. J., 2011. Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne, Sciences & Nature Vol. 8 N°1 : 1 - 11.

Bolivar, P., Cruz-Parades C., Hernandez L. R., Juarez Z. N., Sanchez-Arreola E., Av-Gay Y., Bach H., 2011. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*, Journal of Ethnopharmacology, 137 141– 147, published by Elsevier Ireland Ltd.

Brand-Williams, W., Cuvelier M. E., Berset C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 28.25-30.

Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120p.,

Codina, C., Pajero I., Pekatris C., Kefalas P., 2000. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminal chemiluminescence and DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) free radical assay, Pharmacol Toxicol Method, 44 : 507-512.

Defraigne, J. O., Pincemail J., 2007. Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités, Rev Med Liege 2007; 62 : 4. 2007.

Descheemacker, A. 1979. RAVIMAITSO, 5ème édition, Ambositra, Août. 1979.

Dohou, N., Tahrouch S., Hassani L. M. I., Badoc A., Gmira N., Yamni K., 2003. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelya lythroides*, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 142, 61-78.

Favier, A., 2003. Mécanismes biochimiques, Le stress oxydant, revue L'actualité chimique - Novembre-Décembre 2003, p.107-115.

Fiorrucchi, S., 2006. Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse, Université de Nice-sophia Antipolis.

Gangopadhyay, M., Dewanjee S., Bhattacharya N., Khanra R., Dua T. K., 2015. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry, Journal of Pharmaceutical Analysis ;5(2):75–84.

Grzelak, E. M., Choma I. M., 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography, J. Chromatogr. A (2011), doi:10.1016/j.chroma.2010.12.069.

Gurib-Fakim, A., Gueho J., 1997. Inventaire et étude des plantes médicinales et des plantes aromatiques des Etats de l'océan Indien, Rapport ethnobotanique et phytochimique sur le projet PLARM, Projet FED – COI, 1990-1997.

Kgatle, D. T., 2007. Isolation and characterization of antioxidant compounds from *Combretum apiculatum* (Sond.) subsp *apiculatum*, Departement of Paraclinical Sciences (Phytochemical Program), University of Pretoria, Octobre.

Lancoméga, 2014. Banane : Bienfaits, propriétés, effets secondaires et dangers ?, site "<http://odlg.org/2383/Banane-Bienfaits-Proprietes-Effets-Secondaires-Dangers>"

Luhata, P., A. B. Kanangila, E. K. Kitawa, D. Mulungulungu, J. B. Lumbu, E. Kalonda. 2008. Étude chimique de l'espèce *Jacobinia carnea*., Université de Lubumbashi.

Nelson, S. C., Ploetz R. C., Kepler A. K., 2006. Musa species (banana and plantain), Species Profiles for Pacific Island Agroforestry (www.traditionaltree.org), Traditional Tree Initiative, August, ver. 2.2.

Nouioua, W., 2012. Thème Biodiversité et Ressources phylogénétiques d'un écosystème forestier « *Paeonia mascula* (L.) Mill. ». Mémoire présenté à la Faculté des Sciences de la nature et la vie

Département de Biologie végétale et d'Écologie Pour l'obtention du diplôme de MAGISTER Option : Biodiversité et gestion des écosystèmes.

Popovici, C., Saykova I., Tylkowski B., 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, Revue de génie industriel, 4, 25-39.

Ranarivelo, Y. 2004. Les Grandes familles Chimiques de Produits Naturels, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

Rishika, D., Sharma R., 2012. An update of pharmacological activity of *Psidium guajava* in the management of various disorders, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, Vol. 3(10): 3577-3584

Rizk, A. M. 1982. Constituents of plants growing in Qatar, Fitoterapia, 52 (2), p 35-42.

Roussel, A.-M., Ferry M., 2002. Stress oxydant et vieillissement, Nutrition Clinique et Métabolisme, Volume 16, Issue 4, December 2002, Pages 285–291.

Singh, R. P., Kedare S. B., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, J. Food Sci Technol (July–August) 48(4):412–422.

Streit, M., 2014. Verrues – tableaux cliniques et traitement, Partie 2, Forum Med Suisse ; 14(36):659–669.

Takao, T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakata K., 1994. A simple screening method for antioxidant and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish, Biosci Biotechnol Biochem, 58 : 1780-1783.

Vasquez, J., Delgado C., Couturier G., Ferrero D. M., 2002. Les insectes nuisibles au goyavier (*Psidium guajava* L. : Myrtaceae) en Amazonie péruvienne, Fruits 57 (2002) 323-334, DOI: 10.1051/fruits:2002029