

Nom et Prénom : SAMMAMA AMAL

Date de soutenance : 17/06/2020

Directeur de Thèse : R. BENGUEDDOUR

Sujet de Thèse :

Etude comparative de l'effet des solvants et des techniques d'extraction conventionnelles sur les composés phénoliques et les activités biologiques des fruits du Citrus Limon Burm, Citrus LimettaRisso et Citrus Aurantifolia (Christm.) Swingle de Kenitra

Résumé :

Notre travail contribue à la valorisation des trois espèces (Citrus limon, Citrus limetta et Citrus aurantifolia) en les caractérisant par des études pomologique, organoleptique, nutritionnelle, un screening phytochimique et une évaluation des activités biologiques (antioxydantes et antimicrobiennes).

L'étude pomologique et organoleptique nous a permis de constater que les fruits du Citrus limon appelé Limùn sont de gros calibre 98.3 mm, ellipsoïdales, jaunes pâles et avec un poids moyen de 141,59 g. En outre, les fruits du citrus limetta appelé Limoun Beldi sont de calibre 86,4 mm, aplatie-ronde, de coloration jaune foncé, un poids moyen de 89,09 g. Concernant Les fruits du citrus aurantifolia appelé Limoun Doqq sont sphériques de petit calibre de 43,4 mm, de coloration jaune d'or et avec une odeur caractéristique et typique. Ces trois espèces présentent une teneur moyenne en jus d'environ 36 %. Ils sont caractérisés par une teneur en acidité d'environ 4 g/l et une teneur en sucre de 9 °B ce qui donne un coefficient de maturité égal à 2,25.

La composition nutritionnelle a été évaluée chez le fruit des trois espèces étudiées. Nous avons recherchés essentiellement les sucres, les protéines, les minéraux et la vitamine C. L'espèce de C. limon s'est révélé le plus riche en sucres avec une teneur de 2839,04 mg/100 g. Cependant, la teneur en protéines est la plus faible de 69,63 mg/100 g. En ce qui concerne les minéraux sept éléments (K+, Ca++, P, Mg++, Fe++, Cu++, Zn et Mn) ont été quantifiés par spectrophotométrie d'absorption atomique à flamme. Nous avons révélé des quantités importantes en cinq éléments à savoir le K+, Ca++, P, Mg++ et Fe++. Les teneurs en Cu++ et Zn dans les jus des trois espèces sont moins importantes. La vitamine C reste un constituant majeur présent son analyse a été faite par chromatographie liquide à haute performance. La quantité la plus forte qui a été déterminé est de l'ordre de 111,88 mg/100 g et ceci pour l'espèce Citrus aurantifolia.

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des fruits de Citrus limon, Citrus limetta et Citrus aurantifolia a permis de mettre en évidence la présence de quelques familles de molécules bioactifs (flavonoïdes, tanins, coumarines, caroténoïdes, terpènes et stérols, quinones, alcaloïdes, dérivés anthracéniques, saponosides et huiles essentielles). Cette composition a été confirmée par une analyse chromatographique sur couche mince.

Nous avons utilisé deux techniques d'extraction : la macération et le soxhlet. Quatre solvants d'extraction de polarité différente ont été employés (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol) pour la quantification des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés. Cette étude a montré que le solvant et la méthode d'extraction affectent significativement les rendements, les teneurs en composés phénoliques et les activités biologiques des fruits de C. limon, C. limetta et C. aurantifolia. Les résultats ont montré que le soxhlet reste la meilleure méthode d'extraction. Les solvants polaires (acétate d'éthyle et méthanol) permettent l'obtention des meilleurs rendements d'extraction et des teneurs importantes en polyphénols et en flavonoïdes. Citrus aurantifolia accuse les teneurs les plus élevées pour les épicarpes et les pulpes, respectivement en polyphénols (326,73±9,82 mg et 443,57±3,10 mg EAG g-1 de PF) et en flavonoïdes (133,00±3,55 mg et 138,62±3,21 EQ g-1 de PF). Ces composés mineurs confèrent aux trois espèces des qualités nutritionnelles et thérapeutiques importantes.

L'évaluation in vitro de l'activité antioxydante des différents extraits a été déterminée par le test DPPH. Ce test a montré que les extraits de méthanol et d'acétate d'éthyle par soxhlet possèdent les meilleures activités antioxydantes. Un fort pouvoir antiradicalaire est noté pour les épicarpes et les pulpes du fruit de *C. aurantifolia*, respectivement de 5,13 et 4,89 µg/ml. Cette activité est relativement similaire aux standards à savoir ; l'acide ascorbique (2,48 µg/ml), la quercétine (4,06 µg/ml) et l'acide gallique (7,80 µg/ml).

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits et des antibiotiques in vitro vis-à-vis des bactéries multi-résistantes est effectuée par la méthode de diffusion sur disque et de macro-dilution. Nous avons constaté que les extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyle par soxhlet des fruits de *C. limon*, *C. limetta* et *C. aurantifolia* ont révélé une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *staphylococcus aureus* et d'*entérocooccus faecalis*, avec des CMI situées entre 15,62 – 125 µg/ml. Par contre les extraits dichlorométhaniques des trois espèces ont révélé inactifs vis-à-vis toutes les souches microbiennes testées. En effet les souches Gram+ ont avéré plus résistants aux antibiotiques que les souches Gram-.

MOTS-CLES:

Citrus limon, Citrus limetta, Citrus aurantifolia, Macro et Microéléments, Composés phénoliques, activité antioxydante, Pouvoir antimicrobien, CCM et HPLC.

Abstract :

Our work contributes to the valorisation of the three species (*Citrus limon*, *Citrus limetta* and *Citrus aurantifolia*) by characterizing them by pomological, organoleptic, nutritional studies, a phytochemical screening and an evaluation of biological activities (antioxidants and antimicrobials).

The pomological and organoleptic study allowed us to note that the fruits of *Citrus limon* called “Lîmûn” are of big caliber 98,3 mm, ellipsoidal, pale yellow and with an average weight of 141,59 g. In addition, the fruit of the *Citrus limetta* called “Limoun Beldi” are 86,4 mm caliber, flattened-round, dark yellow in color, an average weight of 89,09 g. Regarding the fruits of *Citrus aurantifolia* called “Limoun Doqq” are spherical small caliber 43,4 mm, golden yellow in color and with a characteristic and typical odor. These three species have an average juice content of about 36%. They are characterized by an acidity content of about 4 g / l and a sugar content of 9 ° B which gives a maturity coefficient equal to 2,25.

The nutritional composition of the fruit was evaluated for the three-species studied. We mainly searched for sugars, proteins, minerals and vitamin C. The species of *C. limon* was found to be the richest in sugars with a content of 2839,04 mg / 100 g. However, the protein content is the lowest of 69,63 mg / 100 g. For minerals, seven elements (K +, Ca ++, P, Mg ++, Fe ++, Cu ++, Zn and Mn) were quantified by flame atomic absorption spectrophotometry. We have revealed important quantities in five elements namely K +, Ca ++, P, Mg ++ and Fe ++. The contents of Cu ++ and Zn in the juices of the three species are less important. Vitamin C remains a major constituent present its analysis was made by high performance liquid chromatography. The highest amount that has been determined is of the order of 111,88 mg / 100 g and this for the species *Citrus aurantifolia*.

The preliminary evaluation of the phytochemical composition of the fruits of *Citrus limon*, *Citrus limetta* and *Citrus aurantifolia* has made it possible to highlight the presence of a few families of bioactive molecules (flavonoids, tannins, coumarins, carotenoids, terpenes and sterols, quinones, alkaloids, anthracene derivatives, saponosides and essential oils). This composition was confirmed by thin layer chromatographic analysis.

We used two extraction techniques: maceration and soxhlet. Four different polarity extraction solvents were used (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol) for the quantification of polyphenols, flavonoids and condensed tannins. This study showed that the solvent and the extraction method significantly affect yields, phenol contents and biological activities of *C. limon*, *C. limetta* and *C. aurantifolia* fruits. The results showed that soxhlet remains the best method of extraction. Polar solvents (ethyl acetate and methanol) make it possible to obtain the best extraction yields and high levels of polyphenols and flavonoids. *Citrus aurantifolia* has the highest levels for epicarp and pulp, respectively in polyphenols

(326.73 ± 9.82 mg and 443.57 ± 3.10 mg EAG g⁻¹ FW) and in flavonoids (133.00 ± 3.55 mg and 138.62 ± 3.21 EQ g⁻¹ of FW). These minor compounds give the three-species important nutritional and therapeutic qualities.

The in vitro evaluation of the antioxidant activity of the various extracts was determined by the DPPH test. This test showed that the extracts of methanol and ethyl acetate by soxhlet have the best antioxidant activities. A strong antiradical power is noted for the epicarp and the fruit pulp of *C. aurantifolia*, respectively of 5,13 and 4,89 $\mu\text{g} / \text{ml}$. This activity is relatively similar to the standards to know; ascorbic acid (2,48 $\mu\text{g} / \text{ml}$), quercitin (4,06 $\mu\text{g} / \text{ml}$) and gallic acid (7,80 $\mu\text{g} / \text{ml}$).

The evaluation of the antibacterial activity of extracts and antibiotics in vitro against multi-resistant bacteria is carried out by the disk diffusion and macro-dilution method. We found that methanolic and ethyl acetate extracts by soxhlet from *C. limon*, *C. limetta* and *C. aurantifolia* fruits showed strong antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* with MICs between 15,62 - 125 $\mu\text{g} / \text{ml}$. On the other hand, the dichloromethane extracts of the three-species proved to be inactive with respect to all the microbial strains tested. Gram + strains proved to be more resistant to antibiotics than Gram-strains.

KEY WORDS:

Citrus limon, Citrus limetta, Citrus aurantifolia, Macro and Microelements, Phenolic compounds, antioxidant activity, Antimicrobial potency, TLC and HPLC