



Phytothérapie

Extraction, optimisation et pouvoir antioxydant des polyphénols des feuilles d'oleastre

Extraction, optimization and antioxidant activity of oleastre leaves polyphenols

Fatima GACIOUI¹, Zinab HADJ AMAR¹, Saliha OUSSAID^{2,3}

¹Laboratoire de Biochimie, Département de Biologie, Université M'Hamed Bouguerra de Boumerdès. Algérie

²Laboratoire de Biomathématiques Biophysique Biochimie et de Scientométrie, Département des Sciences alimentaires, Université Abderrahmane Mira de Béjaïa. Algérie.

³Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Département de Biochimie-Microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, Algérie.

Reçu le 30 septembre 2013, Accepté le 19 janvier 2014

¹Auteur correspondant : saliha.oussaid@univ-bejaia.dz

Résumé Introduction. Les extraits de plantes font actuellement l'objet de nombreuses recherches visant à explorer et exploiter leurs propriétés biologiques. **Objectif.** Le but de cette étude est de déterminer le pouvoir antioxydant des polyphénols contenus dans les feuilles d'oleastre, après leur extraction et leur optimisation, afin de valoriser le patrimoine floristique et de rechercher de nouvelles molécules bioactives. **Matériel et Méthodes.** L'extraction des polyphénols des feuilles d'*Olea europaea sylvestris* est optimisée en utilisant quatre types de solvants. L'activité antioxydante des fractions phénoliques obtenues par l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle ainsi que la fraction aqueuse est déterminée avec le test du phosphomolybdate d'ammonium. **Résultats.** L'acétone à 70% est le meilleur solvant d'extraction avec une concentration de $152,95 \pm 7$ mg d'équivalent acide gallique/g d'extrait sec (EAG/g ES). La plus faible concentration est obtenue avec la fraction d'acétate d'éthyle (73 ± 9 mg EAG/g ES). La fraction aqueuse présente la plus forte teneur en polyphénols ($430 \pm 20,5$ mg EAG/g ES), alors que la teneur en flavonoïdes et en tannins varie de $15,33$ à $21,5$ mg d'équivalent quercétine/g d'extrait sec (EQ/g ES) et de 164 à 237 EAT/g ES, respectivement. Le test de réduction du phosphomolybdate d'ammonium indique que ces extraits exercent un pouvoir antioxydant dose-dépendant, avec une activité plus significative pour la fraction aqueuse. **Conclusion.** Ces résultats laissent suggérer que les polyphénols de l'oléastre peuvent être utilisés comme agents antioxydants.

Mots clés : *Olea europaea sylvestris*, Polyphenols, Extraction, Optimisation, Activité antioxydante

Abstract Introduction. Plant extracts are currently the subject of numerous researches to explore and exploit their biological properties. **Objectives.** The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of oleastre leave polyphenols after their extraction and optimization in order to research new bioactive molecules. **Materials and methods.** Polyphenol extraction from the leaves of *Olea europaea sylvestris* was optimized using four types of solvents. The antioxidant activity of the phenolic fractions from petroleum ether, ethyl acetate and the aqueous fraction was determined with the test of ammonium phosphomolybdate. **Results.** The results showed that acetone 70% was the best extraction solvent with a concentration of 152.95 ± 7 mg GAE (gallic acid equivalents)/g DE (dry extract). The lowest concentration was obtained by the ethyl acetate fraction (73 ± 9 mg GAE/g DE). The aqueous fraction presented the highest polyphenols content (430 ± 20.5 mg GAE/g DE), whereas the content of flavonoids and tannins was ranged between 15.33 to 21.5 mg EQ/g DE (quercetin equivalent) and from 164 to 237 TAE/g ES, (tannic acid equivalent), respectively. Le test de réduction du phosphomolybdate d'ammonium indique que ces extraits exercent un pouvoir antioxydant dose-dépendant, avec une activité plus significative pour la fraction aqueuse. The reduction test of ammonium phosphomolybdate showed that these extracts had a dose-dependent antioxidant activity, which was more pronounced with aqueous fraction. **Conclusion.** These results suggest that oleastre polyphenols can be used as antioxidant agents.

Keywords: *Olea europaea sylvestris*, Polyphenols, Extraction, Optimization, Antioxidant activity

Introduction

Les substances naturelles, comme les molécules bioactives issues des végétaux, suscitent actuellement un intérêt tout particulier, de par leurs multiples activités biologiques antibactériennes [1,2] et antioxydantes [3,4] entre autres, tant appréciées dans le domaine de la santé humaine [4], de l'industrie alimentaire [2,5], pharmaceutique ou cosmétique [4]. En effet, la recherche scientifique a tendance à se focaliser sur l'exploration de ces substances qui constituent une alternative prometteuse aux anciennes substances d'origine synthétique, semi synthétique ou naturelle, dont l'usage s'accompagne souvent d'effets secondaires indésirables. Les polyphénols, molécules bioactives, avec leurs différentes structures ont suscité un regain d'intérêt dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie. Cet intérêt a commencé depuis les années 1990, où les effets bénéfiques sur la santé humaine des produits alimentaires et boissons comprenant des fruits et des légumes semblaient être étroitement associés à la capacité antioxydante de leur contenu en polyphénols. Il semblerait que cette activité soit responsable, pour une grande

partie, de leurs propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti-cancérogènes [6-9].

En Algérie, l'oléiculture occupait une superficie de 226 337 hectares en 2006, soit 33% de la superficie arboricole [9].

La présente étude a pour but de valoriser la variété *Olea europaea sylvestris* (Oléastre ou olivier sauvage) par l'optimisation du solvant d'extraction des polyphénols et l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait phénolique brut et de ses différentes fractions obtenues par extraction liquide/liquide.

Matériel et Méthodes

Préparation du matériel végétal

Le matériel végétal constitué de feuilles d'*Olea europaea sylvestris* a été collecté en février 2011 dans la région d'Isser (Boumerdes). Les feuilles de l'oléastre sont lavées puis séchées à température ambiante jusqu'à stabilité du poids. La matière sèche (54,4% de la matière totale) est broyée (broyeur Ika Labor-technik, Allemagne) puis tamisée. La poudre obtenue est récupérée et conservée dans des sacs de papier à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Choix du type de solvant et extraction

Trois solvants polaires combinés à l'eau, connus pour leur pouvoir extracteur des polyphénols, à savoir l'acétone à 70%, l'éthanol à 70% et le méthanol à 70% [10,11], ainsi qu'un solvant moyennement polaire, l'acétate d'éthyle à 70%, ont été testés. Pour chaque essai, 0,5 g de poudre sont macérés dans 25 mL de solvant pendant 1h à température ambiante. Après centrifugation (centrifugeuse type Sigma 2-16 PK, Allemagne) à 14000 tr/min pendant 20 min, le surnageant est filtré sur du papier Wattman N°1 et le filtrat récupéré est séché à l'étuve puis reconstitué dans du méthanol et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation. L'extraction finale est réalisée selon la méthode décrite par Djeridan et al. [12] modifiée par rapport au solvant utilisé et au temps de macération. Les polyphénols sont extraits de la poudre par une solution hydroacétonique à 70%. A 10 g de poudre sont ajoutés 200 mL de solvant. La macération est effectuée avec renouvellement de solvant trois fois chaque heure, à température ambiante. Après filtration, l'acétone est évaporé (rotavapor type, Buchi R 2000) et l'extrait aqueux est traité par l'éther de pétrole (4 fois, v/v). Une extraction à l'acétate d'éthyle (5 fois v/v) est réalisée sur le résidu aqueux, après avoir rajouté l'acide orthophosphorique 2% et le sulfate d'ammonium [12]. Après évaporation à l'étuve, l'extrait acétate d'éthyle, l'extrait éther de pétrole et l'extrait brut sont reconstitués dans du méthanol et conservés à 4°C, pour les essais quantitatifs et qualitatifs.

Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé selon la méthode décrite par Gil (2000) [13]. Cent µL de chaque extrait sont dilués dans 6 mL d'eau distillée, 0,5 mL de réactif de folin-Ciocalteu et 1,5 mL de bicarbonate (Na_2CO_3) à 200 g/L sont rajoutés. Le volume total est ajusté à 10 mL avec de l'eau distillée. Après une incubation de 2h, à température ambiante et à l'abri de la lumière, la lecture de l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 760 nm. Le contenu en phénols totaux est déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage à l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique (EAG) par g d'extrait sec (ES). Les flavonoïdes sont dosés selon la méthode de Bahorun et al. [14]. Pour 1,5 mL de chaque extrait

est ajoutée la même quantité d' AlCl_3 à 2 % dans du méthanol. La lecture est effectuée à 456 nm après incubation pendant 10 min à température ambiante. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec de la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg équivalent de quercétine par g d'extrait sec (mg EQ/g ES).

La teneur en tannins est déterminée selon la méthode décrite par Hagerman et al. [15]. Un mélange constitué de 0,5 mL de l'extrait et 1 mL de sérum albumine bovine (SAB) à 1 mg/mL, dans du tampon acétate (pH 4,9, 0,2 M), est incubé à 4°C pendant 24h, puis centrifugé à 14000 tr/min pendant 10 min. Deux mL de tampon phosphate préparé avec le sodium dodécyl sulfate (SDS) et le thioéthanolamine (TEA) et 0,5 mL de FeCl_3 sont rajoutés au culot. La lecture est mesurée à 510 nm après 15 min. La teneur en tannins de l'extrait est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage avec l'acide tannique et est exprimée en mg équivalent d'acide tannique par g d'extrait sec (mg EAT/g ES).

Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est déterminée selon la méthode décrite par Abdel-Hameed [16]. Trois mL d'une solution constituée de 0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium (Na_3PO_4) et 4 mM de molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) sont rajoutés à 0,3 mL de chacune des différentes concentrations d'extrait de polyphénols ou d'acide ascorbique comme antioxydant synthétique. Après incubation pendant 90 min à 95°C, la lecture est réalisée au spectrophotomètre (Spectroscan 50 Sigma) à 695 nm.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ES de 3 échantillons. Après analyse de variance, les moyennes sont comparées en fonction des différents traitements (Statistica 5.5). Les valeurs sont considérées comme significatives à $p < 0,05$.

Résultats

Taux d'extraction et teneurs en polyphénols

Le séchage des feuilles d'olivier a été effectué dans le but d'évaluer la teneur en eau. Il a été réalisé à température ambiante et à l'abri de la lumière pour éviter toute dégradation et modification de la composition et de la structure chimique des composés

phénoliques [17]. La matière sèche extraite lors de ce travail est de 54,4%. Les pourcentages en matière sèche extraite avec quatre solvants, après trois heures de macération avec renouvellement de solvant chaque heure, sont représentés dans la Fig. 1(a). Les concentrations en polyphénols correspondantes sont illustrées dans la Fig. 1(b). Les résultats de l'optimisation montrent que la

nature du solvant influe significativement ($P < 0,05$) sur le taux d'extraction total et sur la concentration en polyphénols dans chaque extrait. En effet, le taux d'extraction est de $30,2 \pm 2,03$, 28 ± 4 et 24 ± 4 % avec le méthanol 70%, l'éthanol 70% et l'acétone 70%, respectivement. Un taux significativement plus faible ($P < 0,05$) est obtenu avec l'acétate d'éthyle.

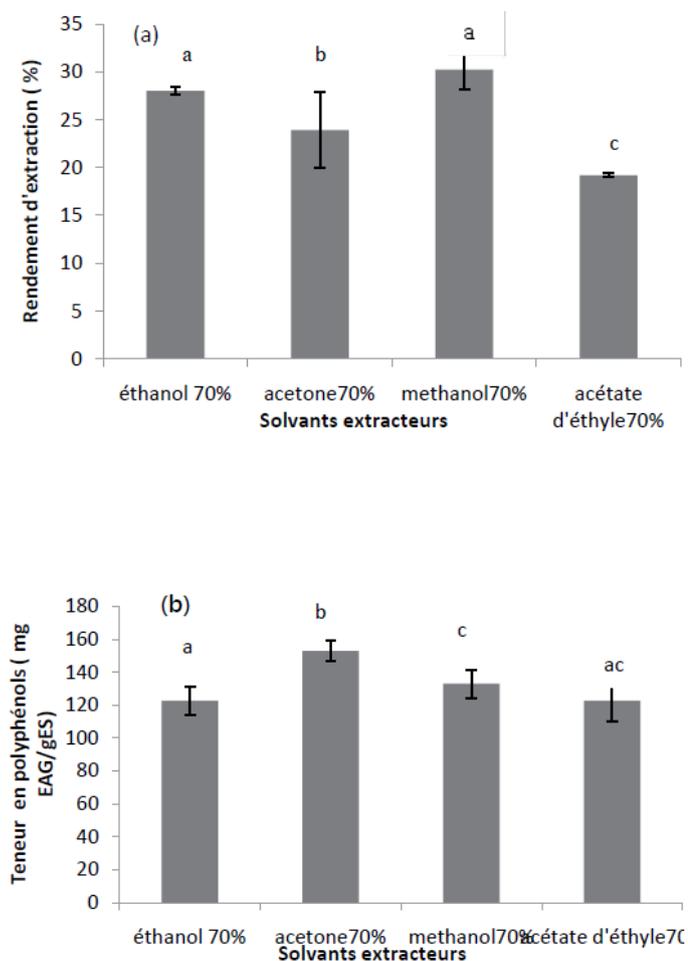


Fig. 1. Taux d'extraction et concentration en polyphénols en fonction du solvant extracteur après trois heures de macération avec renouvellement de solvant chaque heure. (a) Taux d'extraction (%). (b) Teneur en polyphénols (mg EAG/g ES).

Teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins après fractionnement.

Les résultats des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins sont représentés dans la Fig. 2.

Les résultats montrent que l'extrait aqueux contient la teneur en polyphénols la plus élevée et représente 430,95 mg EAG/g ES, alors que le taux de la fraction acétate d'éthyle est de 259,95 mg EAG/ES, et celui de la fraction éther de pétrole est de 173,95 mg EAG/g ES.

La teneur en flavonoïdes est déterminée à par-

tir d'une courbe d'étalonnage à la quercétine. Ces substances sont concentrées au niveau de la fraction aqueuse (21,5 mg EQ/g ES). Les teneurs dans la fraction acétate d'éthyle et la fraction éther de pétrole sont de 15,33 et 14,38 mg EQ/g ES, respectivement.

La teneur en tannins la plus faible est retrouvée dans la fraction éther de pétrole (164,32 mg EAT/g ES). Aucune différence significative n'est notée entre le contenu en tannins présents dans l'extrait aqueux (237,05 mg EAT/g ES) et ceux extraits par l'acétate d'éthyle (232,02 mg EAT/g ES).

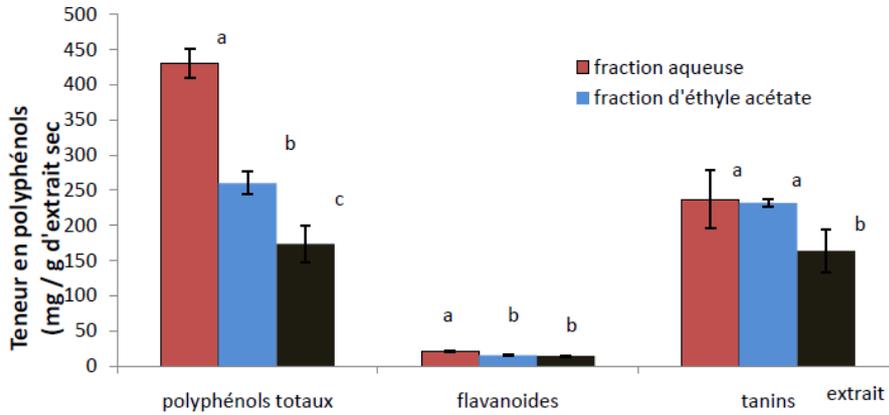


Fig. 2. Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins dans les différents extraits d'*Oleae europaeae* *syrvitis*

Pouvoir antioxydant

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur des extraits à différentes concentrations sont présentés dans la Fig. 3.

Les valeurs obtenues avec l'acide ascorbique (0,35 à 1,84) sont nettement supérieures à celles notées avec la fraction aqueuse (0,2 à 0,9), la fraction acétate d'éthyle (0,1 à 0,47) et la fraction éther de pétrole (0,1 à 0,4).

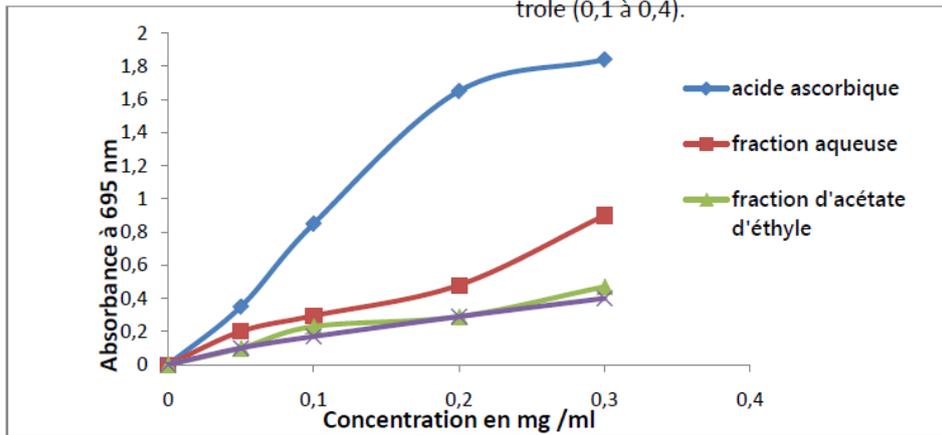


Fig. 3. Pouvoir réducteur des extraits analysés par la méthode du phosphomolybdate d'ammonium

Discussion

La présente étude a pour objectif de valoriser les polyphénols provenant des feuilles de l'oléastre. Nous avons trouvé intéressant de choisir d'abord le solvant d'extraction conduisant à un plus grand résultat quantitatif de ces composés, et par conséquent, à une bonne estimation de l'activité antioxydante dont ils sont responsables.

La valeur du rendement d'extraction est proche de celle rapportée par la littérature. En effet, la matière sèche des feuilles vertes de l'oléastre se situe autour de 50–58%, celle des feuilles sèches autour de 90% [18]. Les résultats d'extraction obtenus montrent que la nature du solvant influe sur le taux d'extraction et que l'éthanol à 70% et le méthanol à 70% ne présentent aucune différence significative. Les méthodes d'extraction par solvant sont diverses et l'extraction solide-liquide est la technique la plus utilisée pour séparer les molécules phénoliques [11]. La solubilité des composés phénoliques dépend du volume et du type de solvant, du degré de polymérisation des substances et les différentes interactions de ces polyphénols formant des complexes insolubles. Les solvants les plus fréquemment utilisés sont le méthanol, l'éthanol, et l'acétone [8-11,19,20]. De plus, les mélanges de solvants polaires, l'acétone, le méthanol et l'éthanol avec l'eau, à des proportions de 70-80% donnent des résultats d'extraction satisfaisants [10,20]. La combinaison solvant polaire/eau permet d'avoir un milieu à polarité modérée qui accroît l'extraction des polyphénols [10].

La quantité des polyphénols extraite par l'acétate d'éthyle est significativement réduite ($P < 0,05$) comparée celle obtenue par les trois autres solvants. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par plusieurs auteurs. Selon certaines études, l'acétone est le meilleur extracteur de polyphénols, particulièrement pour les échantillons riches en tannins [20,21]. Des résultats similaires ont été obtenus par Yap et al. [22] qui ont montré que l'hydroacétone est plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques des fruits que l'hydroéthanol. Une étude menée par Cheynier [23] a montré que la quantité et la qualité des polyphénols varient selon le cultivar, en effet, le cultivar conservalina contient 888 mg EAG/100 g de matière sèche, alors que le cultivar Mischen en contient 2997 mg EAG/100 g de matière sèche. Les différents dosages effectués ont mis en évidence la présence de polyphénols dans les quatre extraits étudiés dans des proportions variables. Cette différence dans l'extraction

des polyphénols indique la variation structurale de ces composés.

Les résultats du fractionnement sont en désaccord avec ceux de Sineiro et al. [24] sur l'extraction des tannins par cinq solvants de différente polarité, qui ont montré que la plupart de ces molécules sont solubles dans les solvants moyennement polaires et qu'une extraction quasi-totale est observée avec l'acétate d'éthyle.

L'activité antioxydante a été testée par la méthode du phosphomolybdate d'ammonium. Les courbes obtenues montrent que l'absorbance des extraits augmente avec l'élévation de la concentration ; cela peut s'expliquer par la présence probable de composés (antioxydants) [3,16]. De plus, les résultats montrent que l'activité exercée par la fraction aqueuse et l'acide ascorbique est significativement plus élevée que celle des deux autres fractions. Le pouvoir réducteur élevé de la fraction aqueuse pourrait être attribué à sa richesse en polyphénols. L'absence de différence significative entre les effets obtenus par les fractions acétate d'éthyle et éther de pétrole pourrait être attribuée à l'absence de différence dans les taux de tannins et à leur faible polarité. En effet, il a été rapporté que les composés extraits par des solvants très polaires exercent un effet *scavenger* plus important que ceux extraits par des solvants peu polaires [25,26].

Conclusion

Les résultats portant sur le choix du solvant d'extraction des polyphénols montrent que la nature du solvant influe sur le taux d'extraction et sur la concentration en polyphénols. En effet, les meilleurs taux d'extraction sont obtenus avec l'éthanol à 70% et le méthanol à 70%, alors que la plus grande quantité de polyphénols est extraite avec l'acétone à 70%. De plus, cette étude montre une activité antioxydante plus prononcée pour l'extrait hydroacétonique, ce qui laisse suggérer que l'oléastre pourrait être utilisé à des fins alimentaires, cosmétiques ou thérapeutiques.

Conflit d'intérêt

Aucun

Références

- [1] Cowan M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(4),564-82.
- [2] Kotzekidou P., Giannakidis P., Boulamatsis A.

- Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *Food Sci Technol* 2008;41:119–27.
- [3] Kaur R., Arora S., Singh B. Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis*. *A. Juss. Bioresour Technol* 2008 ;99(16):7692-98.
- [4] Rayne S., Mazza G. Biological Activities of Extracts from Sumac (*Rhus* spp.): A Review. *Plant Foods Human Nutr* 2007;62(4):165-75.
- [5] Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* 2004;1:3-6.
- [6] Aquilano K., Baldelli S., Giuseppe R., Ciriolo M.R. Role of Nitric Oxide Synthases in Parkinson's Disease: A Review On the Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Polyphenols. *Neurochem Res* 2008;33:2416-26.
- [7] Ivanisova E., Tokar M., Mocko Karolina., Bojnonska T., Marechek J., Mandelova A. Antioxydant activity of selected plant products. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 2013;2:1692-703.
- [8] Tian F., Li B., Ji B., Yang J., Zhang, G., Chen Y., Luo Y. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Gallachinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chem* 2009;113:173-9.
- [9] Anonyme. Analyse statistique de l'évolution de la culture des principaux produits agricoles durant la période 1998-2006. Ministère de l'agriculture. Direction des statistiques agricoles et des enquêtes économiques, 2006 ; 60 p.
- [10] Spigno G., Tarmelli L., De Faveri DM. Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J Food Engineering* 2007;81(1):200-8.
- [11] Naczek M., Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41: 1523-42.
- [12] Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutasouna D., Stocker P., Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolics compounds. *Food Chem* 2006;97:654-60.
- [13] Gil MI., Toms-Barbern FA., Hess-Pierce B., Holcroft DM., Kader AA. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *J Agric Food Chem* 2000;48:4581-9.
- [14] Baharun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., et al. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch Drug Res* 1996 ;46:1086-8.
- [15] Hagerman AE., Butler LG. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannin. *J Agric Food Chem* 1978;26(4):809-12.
- [16] Abdel-Hameed ES. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem* 2008;114:1271-7.
- [17] Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular. *Reperfusion Physiol* 2004;61 (3):461-70.
- [18] Civantos L. Valorisation des sous-produits de l'olivier. Réunion du comité technique (FAO). 1983;14:3-145.
- [19] Hayouni EA., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem* 2007;105:1126-34.
- [20] Contini M., Baccelloni S., Massantini R., Anelli G. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin was tested by long maceration at room temperature. *Food Chem* 2008; 110:659-69.
- [21] Edelsys CH., Ariel MI., Luis MC., Francisco ML., Wolf DS. Calculation of the salvation effects on the structure of natural flavonoids in aqueous and acetone phases. *J Molecular Structure* 2005;715:227-39.
- [22] Yap CF., HO CW., Chan SW., Lee CY., Leong YS. Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolic Compounds from Star Fruit (*Averrhoa carambola* L.) Residues. *Sains Malaysiana* 2009;38(4):511-52.
- [23] Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than of tenthought. *Am Clin Nutr* 2005;8: 223-29.
- [24] Sineiro J., Franco D., Rubilar M., Sánchez M., Jerez M., Pinelo M., et al. Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidant power. *Elec J Env Agricult Food Chem* 2008;7(8):3210-6.
- [25] Turkmen N., Sari F., Velioglu S. Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin Ciocalteu methods. *Food Chem* 2006; 99:835-41.