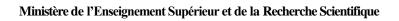


République Algérienne Démocratique et Populaire





Université ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCEN

Faculté des sciences

Département de Chimie

LABORATOIRE DE CHIMIE ORGANIQUE, SUBSTANCES NATURELLES ET ANALYSES

DOMAINE: SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE: CHIMIE

SPECIALITE: CHIMIE BIO ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

MEMOIRE DE MASTER

Soutenue le 14/06/2017 par

Abdelmajid BELKHODJA

ANALYSE CHIMIQUE DES GRAINES D'ANONE

Directeur de mémoire : M. Zoheir ARRAR

Composition du jury:

Examinateur: M.Hocine ALLALI

❖ Président du jury : *M.Djamel BENDI ABDELLAH*

Je dédie ce mémoire:

A ceux qui m'aiment

Je remercie:

Allah d'être mon appuie, mon repère, ma solution et mon éternel espoir...

Ma mère, qui ma tous donné; ainsi que toute ma famille. Dieu vous protège...

La direction générale de la recherche scientifique et développement technologique (DGRST) d'avoir financé ce travail.

M.Kajima Mulengi Joseph, le directeur du laboratoire de chimie organique, substances naturelles et analyse (COSNA), pour son accueil, ses conseils et sa gentillesse.

Mon généreux encadreur, **M. Arrar Zoheir**, pour ses conseils, ses encouragements et pour sa confiance en moi.

M.Djamel BENDI ABDELLAH, d'avoir accepté d'être président du jury, et pour sa grande disponibilité.

M.Hocine ALLALI, d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail.

Les doctorantes Imene LAZOUNI, Imene MAMI et Nadjia MERED pour leurs efforts lors des analyses spectrales, leurs aide et sur tout pour leurs présence dans les moments fortes de mon cursus.

Table des matières

- Liste des figures
- Liste des tableaux
- Liste des shémas
- Liste des abréviations

Introduction	1
Partie bibliographique	2
Chapitre 1 : Annona cherimola	2
1.1 Écologie	2
1.2 Origine et répartition géographique	2
1.3 Caractères morphologiques	3
1.4 Composition nutritionnelle	4
1.5 Usages	4
1.6 Constituants phytochimiques	5
Chapitre 2 : Les corps gras	6
2.1 Les triglycérides	6
2.2 Les acides gras	6
2.2.1 Définition	6
2.2.3 Classification	7
2.2.4 Rôle des acides gras	8
2.3 Les insaponifiables	8
Partie expérimentale	10
Chapitre 1 : Matériels et méthodes	10
1.1 Matériel végétal	10
1.1.1 Détermination de la teneur en matière sèche	10
1.1.2 Détermination de la teneur en eau et en matières volatiles	10
1.1.3 Détermination de la teneur en lipides	10

1.2 Extrait huileux des graines d'anone	11
1.2.1 Extraction de l'huile (au Soxhlet)	11
1.2.2 Analyse physico-chimiques d'extrait huileux	12
1.2.3 Valorisation des acides gras de l'extrait huileux	16
1.2.4 Tests phytochimiques de la fraction des insaponifiables	21
1.3 Extrait méthanolique des graines d'anone	21
1.3.1 Obtention de l'extrait méthanolique	21
1.3.2 Tests phytochimiques de l'extrait méthanolique	22
1.4 Activité antioxydante	22
Chapitre 2 : Résultats et discussions	24
2.1 Composition biochimique des graines d'anone	24
2.2 Extrait huileux des graines d'anone	24
2.2.1 Extraction de l'huile (au Soxhlet)	24
2.2.2 Propriétés physico-chimiques de l'huile des graines d'anone	24
2.2.3 Valorisation des acides gras de l'extrait huileux	28
2.2.4 Etude de la fraction des insaponifiables	35
2.3 Extrait méthanolique des graines d'anone	35
2.4 Activité antioxydante	36
Conclusion générale	38
Références	20
RCICICIOCS	39

Listes des figures

- Figure 1. Annona cherimola: feuilles, fleurs, fruits et graines.
- **Figure 2.** Exemples d'AG: structures et nomenclatures.
- **Figure 3.** Exemples d'insaponifiables.
- **Figure 4.** Montage d'un extracteur de Soxhlet.
- Figure 5. Structure du Poly (bicyanopropyl) siloxane.
- Figure 6. Structure chimique du radical libre DPPH.
- Figure 7. Spectre IR des EMAG préparés par transestérification.
- Figure 8. Spectre IR des EMAG préparées par saponification en présence de BF₃.
- Figure 9. Spectre IR des EMAG préparées par saponification en présence de HCl.
- Figure 10. Chromatogramme des EMAG préparés par transestérification.
- Figure 11. Chromatogramme des EMAG préparés par estérification en présence de BF₃.
- **Figure 12.** Chromatogramme des EMAG préparés par estérification en présence de BF₃ (après changement des conditions).
- Figure 13. Chromatogramme des EMAG préparés par estérification en présence de HCl.
- Figure 14. Activité antioxydante DPPH de l'extrait huileux, extrait méthanolique et la vitamine C.

Liste des tableaux

- **Tableau 1.** Noms vernaculaires de *l'Annona cherimola*.
- **Tableau 2.** Composition nutritionnelle de 100 g de pâtes d'Annona cherimola.
- **Tableau 3.** La composition biochimique des graines *d'Annona cherimola*.
- **Tableau 4.** Caractéristiques de l'extrait huileux obtenu des graines d'Annona cherimola.
- **Tableau 5.** Paramètres physico-chimiques de l'extrait huileux des graines d'Annona cherimola.
- **Tableau 6.** Densités de quelques huiles végétales.
- Tableau 7. Indices de réfraction de quelques huiles.
- Tableau 8. Indices d'acide de quelques huiles végétales.
- **Tableau 9.** Indices de saponification de quelques huiles végétales.
- **Tableau 10.** Indices de peroxyde de quelques huiles végétales.
- Tableau 11. Indices d'iode de quelques huiles végétales.
- **Tableau 12.** Identification des EMAG préparés par transestérification.
- **Tableau 13.** Identification des EMAG préparés par estérification en présence de HCl.
- Tableau 14. Teneur en insaponifiables de quelque huiles végétales.
- **Tableau 15.** Tests phytochimiques de la fraction des insaponifiables.
- **Tableau 16.** Tests phytochimiques de l'extrait méthanolique.
- **Tableau 17.** Activité antioxydante des extraits huileux et méthanolique.

Liste des schémas

Schéma 1. Réaction d'estérification des glycérols.

Schéma 2. Réaction de transestérification.

Schéma 3. Réaction de saponification.

Schéma 4. Réaction -basique pour l'obtention des acides gras.

Schéma 5. Réaction d'estérification.

Liste des abréviations

AG: Acide gras.

AGS: Acide gras saturé.

AGI : Acide gras insaturé.

AGMI : Acide gras monoinsaturé.

AGPI : Acide gras polyinsaturé.

EMAG: Esters méthyliques d'acides gras.

CPG: Chromatographie en phase gazeuse.

Introduction

Depuis le début de la civilisation humaine, la nature a été une source d'agents médicinaux et un nombre impressionnant de médicaments modernes ont été isolé à partir de sources naturelles. Beaucoup de ces isolements reposent sur l'utilisation des agents traditionnels de la médecine que compose un grand nombre de plantes avec différentes importances médicinales et pharmacologiques et représentent donc un réservoir inestimable de nouvelles molécules bioactives.

Au cours des dernières décennies il y a eu de plus en plus d'intérêt dans l'étude des plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle en différentes parties du monde. La phytochimie joue un rôle important dans l'identification des médicaments. L'objectif principal des études est d'enquêter sur la présence de diverses substances phytochimiques et contrôler leurs activités. Plusieurs études ont montré la forte corrélation entre la consommation de fruits dans la prévention et le traitement de diverses maladies [1]. En plus de leur goût délicieux et de leur saveur, les fruits exotiques sont une source importante de composés bioactifs dans l'alimentation humaine. De plus, la consommation de fruits exotiques s'accroît sur les marchés nationaux et internationaux en raison de la reconnaissance croissante de leur valeur nutritive [2].

L'Annona cherimola (Annonacée) est l'un des fruits tropicaux qui est devenu une culture importante en raison de ses excellentes propriétés sensorielles et parce que c'est une source de composés bioactifs qui montrent tellement de caractéristiques fonctionnelles telles que leurs activités antitumorale, antioxydante et antimicrobienne qu'il est intéressant de l'étudier, en totalité ou en partie.

L'objectif du présent travail est l'analyse chimique des graines d'anone.

La présentation de nos travaux est répartie comme suit :

La première partie est consacrée à une étude bibliographique et une présentation botanique de notre fruit *Annona cherimola*; ainsi que la présentation des travaux scientifiques réalisés sur ce fruit.

La deuxième partie concernera l'étude de la composition chimique des graines d'annone. Une connaissance de cette composition (dont environ 30% est de l'huile) et des tests biochimiques qui seront alors réalisés sur une partie ou la totalité de leurs extraits nous guiderons alors sur la suite des travaux à effectuer afin de valoriser cette partie non utilisée de la plante.

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Annona cherimola

L'anone (*Annona cherimola*), de la famille des *Annonacées*, est considéré par beaucoup, d'un point de vue de qualité, comme le meilleur fruit du genre *Annona* et même comme un des meilleurs fruits subtropicaux, d'où son nom « Reine des fruits subtropicaux » [3]. Il est commercialement cultivé pour ses fruits comestibles et pour des utilisations traditionnelles.

Tableau 1. Noms vernaculaires de *l'Annona cherimola* [4]

Langage	Noms communs
Arabe	القشطة
Anglais	cherimoya, custard apple
Français	anone, cherimolier, cherimole
Portugaise	grabiola, graveola, graviola
Espagnol	anonaposhte, cherimolia, cherimoyer, cherimolla, cherimoya
Allemand	cherimoya, cherimolia, cherimoyabaum, chirimoya
Japonais	cherimoa, cherimoya
Hindi	hanumanphal, marytiphal
Mexicain	poox

1.1 Écologie

L'Annona cherimola est principalement cultivée dans les hautes terres de niveau de la mer jusqu'à environ 1400 m d'altitude. Dans la Colombie et en Équateur, elle pousse naturellement en altitude entre 1400-2000 m où la température varie entre 17-20°C [4].

1.2 Origine et répartition géographique

Bien qu'il n'y ait encore aucun accord définitif sur l'emplacement exact du centre d'origine de *l'Annona cherimola*, de nombreux chercheurs comprennent le Pérou comme centre d'origine

mais d'autres affirment que le fruit était inconnu au Pérou jusqu'à après que les graines ont été envoyées par P. Bernabé Cobo du Guatemala en 1629 [4].

Les conditions édapho-climatiques du Madeira Island sont favorables pour la production de fruits tropicaux et subtropicaux. La production de *l'Annona cherimola* à Madeira Island demeure depuis sa colonisation et aujourd'hui à un rôle important pour le développement économique avec une production annuelle autour de 1000 tonnes par ans. Il est également cultivé à petite échelle aux États-Unis, au Chili, et en Espagne [4].

1.3 Caractères morphologiques

L'Annona cherimola est un semi-décidue ou arbuste ou petit arbre atteignant 7 m de hauteur. L'arborescence de l'anone est en érection mais peu ramifiée [4].

Feuilles

Les feuilles sont brièvement caduques à semi-caduques. Elles sont alternatives, deux rangées, avec des pétioles velus minutieusement ; ovées à elliptiques, l'apex obtus a obtusément aigu au sommet, légèrement pubescentes sur la face supérieure, velouté sur la surface inférieure [3].

Fleurs

Fleurs parfumées, de couleur blanc verdâtre ou jaunâtre, solitaires ou en groupe de deux ou trois, courtes surtiges velues, avec trois tépales pétaloïdes verdâtres, charnus, allongés et trois tépales intérieurs plus petits [4].

Fruits

Le fruit est conique ou un peu en forme de cœur, de 10 à 20 cm de long et jusqu'à 10 cm de largeur, poids moyen des vaisseaux : 150-500 g. La peau peut être lisse avec des marques comme impression doigt ou recouverte de protubérances coniques ou arrondies. Le fruit peut se séparer en carpelles et l'endocarpe, crème blanc, a un aspect granuleux. Dans chaque carpelle fertile on trouve des graines noires ovales, aplaties, dures et lisses, mesurant de 1.25 à 2 cm de long [3].



Figure 1. Annona cherimola: feuilles, fleurs, fruits et graines.

1.4 Composition nutritionnelle

La composition nutritionnelle de l'anone est celui d'un fruit doux mais avec une teneur élevée en glucides et faible teneur en gras (**tableau 2**). Sa teneur en vitamine A est modeste, mais c'est une bonne source de thiamine, riboflavine, niacine, fer, calcium et de phosphore [4].

Tableau 2. Composition nutritionnelle de 100 g de pâtes d'*Annona cherimola* [4].

Constituants	Quantité (par 100g de la partie
	comestible)
Eau	77.1g
Protéines	1.9g
Graisses	0.1g
Glucides	18.2g
Fibres	2g
Cendres	0.7g
Calcium	32mg
Phosphore	37mg
Fer	0.5mg
Vitamine A	0.01 IU
Thiamine (Vitamine B1)	0.1 mg
Riboflavine (Vitamine B2)	0.14 mg
Niacine	0.9 mg
Acide ascorbique (Vitamine C)	5 mg
Calories	73 Kcal

1.5 Usages

L'anone est essentiellement un dessert qui est consommé frais. Il peut également être utilisé pour faire de la crème glacée, des milkshakes ou des sorbets et est aussi transformé en yaourts, jus et flans. En raison de ses caractéristiques enzymatiques, l'anone ne peut pas être soumise à des procédés thermiques et pour son traitement s'est conseillé d'utiliser la réfrigération ou bien la congélation avec l'ajout d'antioxydants pour éviter l'oxydation enzymatique [4].

Traditionnellement, les graines d'anone sont broyées et utilisées comme insecticides, surtout pour tuer les poux et la guérison des affections cutanées parasitaires. Une décoction de l'écorce est utilisée comme un tonique et un remède contre la diarrhée. La racine est mâchée pour soulager les

maux de dents et une décoction de la racine est utilisée pour traiter les fièvres. Une décoction de feuilles est utilisée pour traiter les vers. Ces derniers servent aussi à tanner le cuir [3].

Biochimiquement, les graines d'anones sont une source importante d'acétogénines, un type d'alcaloïde, qui montrent des activités antiparasitaires et cytotoxiques qui sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique [5].

1.6 Constituants phytochimiques

L'Annona cherimola contient des alcaloïdes, des flavonoïdes, des glycosides, des saponines, des tanins, des glucides, des protéines, des composés phénoliques, des phytostérols et des acides aminés [4].

Les divers constituants chimiques isolés de tige et des graines de la plante y compris l'annocherine A et B, cherianoine, aromina, N-cis- caffeoyltyramine, dihydroféruloyltyramine, N-trans-feruloylmethoxytyramine et N-cis-feruloyltylmethoxytyramine. Les graines contiennent des cyclopeptides : cherimolacyclopeptide A, B, C, D et E [4].

Les constituants volatils de l'écorce de *l'Annona cherimola* ont été identifiés à partir de l'huile essentielle obtenue par distillation et étudiés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et spectrométrie de masse (SM). Les principaux composés ont été identifiés comme butanoate de méthyle, butanoate de butyle, 3-méthyle butanoate et 5-hydroxyméthyl-2- furfural [4].

Chapitre 2: Les corps gras

Les principaux constituants d'un corps gras animal ou végétal sont les triglycérides, les acides gras et les insaponifiables.

2.1 Les triglycérides

Un triglycéride est le résultat d'une réaction d'estérification d'une molécule de glycérol par trois molécules d'acide gras (AG). Si ces derniers sont identiques, le triglycéride formé est homogène. Par contre, un triglycéride hétérogène comporte deux ou trois AG différents [6].

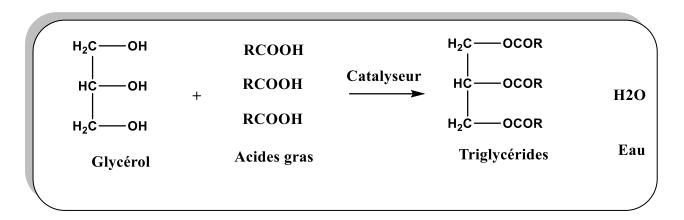


Schéma 1. Réaction d'estérification des glycérols

Les triglycérides ont un rôle principal dont ils sont des constituants de réserve d'énergie dans les tissus adipeux des animaux [6].

2.2 Les acides gras

Les lipides sont divisés en deux catégories principales : lipides simples et lipides complexes.

Les lipides complexes sont ceux qui sont facilement hydrolysés en composant plus simples et la plupart parmi eux sont appelés acides gras [7].

2.2.1 Définition

Les AG sont constitués par une chaîne hydrocarbonée qui présente à l'extrémité un groupement méthyle (-CH₃) et à l'autre extrémité un groupement carboxyle (-COOH) [7]; et se sont classés selon leurs structures en différenciant par le nombre d'atomes de carbone et d'insaturations qui leurs confèrent des propriétés différentes [6].

2.2.3 Classification

On peut classer et nommer les AG en se basant sur deux propriétés différentes : la longueur et l'insaturation de la chaîne hydrocarbonée [6,7].

Longueur de la chaîne hydrocarbonée

Par longueur de chaîne, on distingue les AG:

- à courtes chaînes comportant entre 4 et 8 atomes de carbone;
- à moyennes chaînes comportant entre 8 et 12 atomes de carbone;
- à longues chaînes contenant entre 14 et 18 atomes de carbone;
- à très longues chaînes renfermant 20 atomes de carbone et plus.

Insaturation de la chaîne hydrocarbonée

- Acides gras saturés (AGS)

On parle d'AGS lorsqu'il n'y a aucune insaturation dans la chaîne hydrocarbonée dont ils ont pour formule générale : H₃C-(CH₂)_n-COOH.

- Acides gras mono-insaturés (AGMI)

Il s'agit d'AG qui comporte qu'une seule double liaison C=C liée de part et d'autre à deux chaînes n et p de groupement méthylène CH₂. Leurs formules générales sont de la forme suivante : H₃C— (CH₂)n— HC=CH— (CH₂)p— COOH où n et p sont des nombres entiers positifs ou nuls. -Acides gras polyinsaturés (AGPI)

Ce sont des AG qui possèdent dans leur chaîne hydrocarbonée deux ou plusieurs doubles liaisons C=C; et qui se distinguent les uns des autres par le nombre et la position de l'insaturation.

Acide stéarique aucune double liaison « saturé » (C18 :0)

Acide oléique une double liaison « mono-insaturé » (C18:1, ω9)

Acide linoléique deux doubles liaisons « polyinsaturés » (C18:2, ω6)

Acide α-linolénique trois doubles liaisons «polyinsaturé » (18:3, ω3)

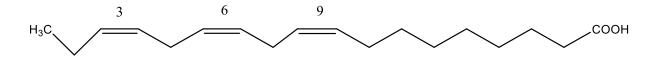


Figure 2. Exemples d'AG: structures et nomenclatures

2.2.4 Rôle des acides gras

En regroupant les trois classes d'AG (AGS, AGMI et AGPI), se sont démontrés comme une source d'énergie pour l'organisme humain. Par conséquent, indépendamment, les AGMI et les AGPI sont reconnus en plus comme [6] :

- Constituants fondamentaux des phospholipides des membranes cellulaires.
- Précurseurs de molécules régulant les fonctions cellulaires telles que :
- ✓ Les prostaglandines et les fonctions reproductrices.
- ✓ Les thromboxanes et les fonctions plaquettaires.
- Régulation de l'expression de gènes impliqués dans leur propre transport et leur métabolisme.
- Substances pour abaisser le mauvais cholestérol (cholestérol LDL) et pour augmenter le bon cholestérol (cholestérol HDL).

2.3 Les insaponifiables

Ce sont les constituants mineurs d'un corps gras (environ 1%) résultant l'ensemble des composés plus ou moins complexes qui ne sont pas esters comme par exemples :

Les tocophérols

Les tocophérols recouvrent plusieurs composés qui ont une propriété antioxydative tels que α -tocophérol, β -tocophérol, y-tocophérol et la vitamine E.

Les phytostérols

Les stérols végétaux ou bien les phytostérols sont des stéroïdes qui inhibent l'absorption digestive du cholestérol et accélèrent l'efflux de cholestérol hors des entérocytes vers la lumière intestinale.

$$\beta$$
-Sitostérol α -Tocophérol

Figure 3. Exemples d'insaponifiables

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

1.1 Matériel végétal

Les graines d'anone que nous avons utilisée pour réaliser ce travail ont été importées du sud d'Europe. L'anone a une forme conique et une peau non comestible de couleur jaune-vert recouverte de protubérances arrondies, sa pulpe est blanche avec un goût très apprécié. Ce fruit est caractérisé par des graines noires ovales, aplaties, dures et lisses dont nous nous sommes intéressés pour réaliser l'objectif principal de ce mémoire.

Afin de faciliter l'extraction et éviter d'extraire la matière sèche sans intérêt, on a décapsulé et décortiqué notre matière végétale ; ensuite, on a laissé les graines sécher puis on les a broyées pour obtenir une poudre fine qui a servi pour la préparation des extraits.

1.1.1 Détermination de la teneur en matière sèche

La teneur en matière sèche $\mathbf{M_s}$ est exprimée en pourcentage massique et est déterminé sur une masse d'environ 1 g des graines broyées, en mettant dans une étuve à 100°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante [8].

$$M_s = \frac{m_f}{m_i} \times 100$$

 $\underline{O\grave{u}}$ $\mathbf{m_f}$: représente la masse finale en grammes (après séchage).

m_i: représente la masse initiale en grammes.

1.1.2 Détermination de la teneur en eau et en matières volatiles

La teneur en eau et en matière volatile (ou humidité) est aussi un pourcentage massique noté ${\bf H}$ et se déduit de la valeur de M_S par la relation suivante :

$$H = 100 - M_S$$

1.1.3 Détermination de la teneur en lipides

La teneur en lipides **L** est le rendement en huile obtenu après une extraction solide-liquide en utilisant la technique d'extraction au soxhlet, et est déterminée par la formule suivante :

$$L = \frac{m_f}{m_i} \times 100$$

 \underline{Ou} $\mathbf{m_f}$: représente la masse en grammes de l'huile obtenue.

m_i: représente la masse en grammes de la matière végétale.

1.2 Extrait huileux des graines d'anone

1.2.1 Extraction de l'huile (au Soxhlet)

L'extraction par Soxhlet est la technique la plus utilisée au laboratoire pour extraire des graisses et des huiles à partir des plantes.

L'extracteur du type Soxhlet est équipé d'un réservoir à siphon dans lequel on introduit une cartouche cellulosique qui est déjà remplie avec une quantité de 20 g du broyat. Le réservoir à siphon est relié d'une part à un réfrigérant à serpentin et d'autre part à un ballon monocol de 500 mL, ce dernier est rempli avec un volume de 250 mL d'hexane (le solvant approprié pour l'extraction de la matière grasse).

L'extraction est maintenue continuellement pour une durée de 6 à 8 heures et l'extrait est recueilli à l'aide d'un évaporateur rotatif qui est relié à une trompe à eau dans le but d'obtenir un vide modéré pouvant atteindre la pression de vapeur saturante de l'eau, en chauffant délicatement à une température de 38 à 40°C. À la fin, un barbotage de l'azote a été réalisé pour se débarrasser de toutes traces du solvant non évaporé.

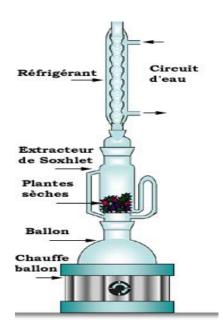


Figure 4. Montage d'un extracteur de Soxhlet

Le rendement en huile est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile obtenue et la masse de la matière végétale sèche [8].

$$R = \frac{m_1}{m_0} \times 100$$

<u>Où</u> **m**₀: représente la masse en grammes de la matière végétale.

m₁ : représente la masse en grammes de l'huile obtenue.

1.2.2 Analyse physico-chimiques d'extrait huileux

> Propriétés physiques

• Densité relative

La densité relative nous renseigne sur le groupe auquel appartient une huile. Elle est définie comme étant le rapport de la masse volumique d'un corps sur celle d'un corps pris comme référence. Généralement pour les solides et les liquides, le corps de référence est l'eau [9].

À 20°C, nous avons utilisé la méthode des pesées avec une balance analytique très précise de l'ordre de 10⁻⁴g.

La densité relative est déterminée par la formule suivante :

$$d = \frac{m_h}{m_{equ}}$$

<u>Où</u> mh : représente la masse d'un certain volume de l'huile exprimée en grammes.
 meau : représente la masse d'un volume égal d'eau distillée exprimée en grammes.

• Indice de réfraction

L'indice de réfraction (IR) est caractéristique du groupe auquel appartiennent les huiles.

L'indice de réfraction d'un milieu à une longueur d'onde donnée mesure le facteur de réduction de la vitesse de phase de la lumière dans le milieu par rapport au vide [9].

La mesure de l'indice de réfraction a été faite à une température de 20°C par le biais d'un réfractomètre relié à un thermostat.

Protocole:

Après que la surface des prismes du réfractomètre a été nettoyée avec l'hexane puis essuyée avec du papier Joseph, on branche la circulation d'eau sur le thermostat à 20°C puis on attend quelques minutes pour que l'équilibre de température soit atteint et après étalonnage de l'appareil avec de l'eau distillée à 20°C (n²⁰_D=1.3330), 2 à 3 gouttes d'huile sont déposées entre les prismes.

On déplace alors la lunette de visée pour que la ligne de séparation des deux plages (claire et sombre) se situe à la croisée des fils du réticule et on lit la valeur de l'indice de réfraction de notre huile à 20°C.

> Propriétés chimiques

• Indice d'acide

Pour quantifier les acides libres d'une huile, on détermine l'indice d'acide (I_A) correspondant au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres présents dans un gramme de corps gras [9]. Cet indice est déterminé en effectuant un dosage colorimétrique de notre solution (corps gras dissout dans un solvant organique, éthanol/cyclohexane en proportions égales) par un excès connu de potasse alcoolique.

L'indice d'acide est calculé par la relation suivante :

$$I_A = \frac{C \times V \times M_{KOH}}{m_h}$$

Où V : représente le volume de KOH au point d'équivalence en millilitre.

C : représente la concentration de KOH en mole par litre.

MKOH: représente la masse molaire de KOH en grammes par mole.

m_h: représente la masse d'huile pesée en grammes.

Protocole:

Après avoir pesé 0,2 g d'huile, on verse alternativement 10 mL d'éthanol (96%) et 10 mL de cyclohexane dans un erlenmeyer de 100 mL. On ajoute l'indicateur coloré (2 gouttes de phénolphtaléine) et on porte le tout sous agitation jusqu'à dissolution ; ensuite, on dose avec une solution éthanolique de KOH (0.01M) jusqu'à l'apparition d'une coloration rose persistante.

• Indice de saponification

L'hydrolyse ou la saponification des esters d'une huile donne lieu à la production des sels d'acides gras et à des glycérols.

L'indice de saponification (**I**s) est la masse d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et pour saponifier les acides gras combinés (triglycérides) dans un gramme de corps gras [9]. Cet indice est déterminé en effectuant un dosage en retour.

Le corps gras est mis en solution dans un solvant organique (mélange v/v d'éthanol et de cyclohexane) puis soumis à une ébullition à reflux.

Le corps gras réagit avec la potasse alcoolique, et l'excès de cette dernière est dosée par une solution d'acide chlorhydrique.

L'indice de saponification est calculé par la relation suivante :

$$I_{S} = \frac{(V_{b} - V_{E}) \times C_{HCl} \times M_{KOH}}{m_{b}}$$

 \underline{Ou} V_b: le volume de HCl titrant le blanc en millilitre.

V_E: le volume de HCl titrant le corps gras en millilitre.

CHCI: représente la concentration de l'acide chlorhydrique en mole par litre.

Mkoh: représente la masse molaire de KOH en grammes par mole.

m_h: représente la masse d'huile pesée en grammes.

Protocole:

Dans un erlenmeyer de 100 mL, on dissout 0.2 g d'huile dans un mélange de solvants constitué d'éthanol (96%) et de chloroforme en quantités égales ; ensuite, on introduit un volume de 10 mL de cette solution dans un autre erlenmeyer de 100 mL puis on ajoute 25 mL d'une solution de KOH éthanolique (0.5 M), et le tout est porté à reflux pendant 1 heure. Après refroidissement, on ajoute 2 gouttes de phénolphtaléine et on effectue un dosage avec une solution de HCl (0.5 M). La disparition de la couleur rose de la phénolphtaléine nous renseigne sur le point d'équivalence. Dans les mêmes conditions un essai à blanc est réalisé.

• Indice d'estérification

L'indice d'estérification (IE) est la quantité de potasse en milligramme nécessaire pour saponifier un gramme d'huile dépouillé d'acide gras [9].

L'indice d'estérification est calculé par la relation suivante :

$$I_E = I_S - I_A$$

 $\underline{Où}$ Is: Indice de saponification en milligrammes de KOH par un gramme d'huile.

I_A: Indice d'acide en milligrammes KOH par un gramme d'huile.

• Indice de peroxyde

L'extrait huileux est constitué principalement des composés qui possèdent des insaturations dans leurs chaines carboniques telles que les lipides, acide gras, glycérides, triglycéride, etc....

L'indice de peroxyde (**I**_P) d'un corps gras est défini comme étant le nombre de milliéquivalent d'oxygène actif par kilogramme de corps gras [9]. Cet indice est calculé à partir de l'iode libéré de l'iodure de potassium, en réalisant un titrage.

L'indice de peroxyde est calculé par la relation suivante :

$$I_P = \frac{(V_E - V_b) \times 10}{m_h}$$

<u>Où</u> VE: représente le volume de thiosulfate en millilitre.

Vb: représente le volume de thiosulfate pour blanc en millilitre.

m_h: représente la masse d'huile exactement pesée en grammes.

Protocole:

Pendant 10 minutes, on fait barboter de l'azote dans un monocol de 250 mL et on le ferme immédiatement. On pèse par la suite une quantité de 0.4 g de l'extrait huileux puis on ajoute un mélange de 10 mL de chloroforme et 15 mL d'acide acétique. Après agitation, on ajoute 1g d'iodure de potassium et on laisse agir à l'obscurité pendant 5 minutes. On arrête la réaction en ajoutant 75 mL d'eau distillée. À la fin l'empois d'amidon est ajouté, puis le tout est mis sous agitation. La présence du peroxyde est indiquée s'il y a apparition d'une couleur violacée. Si c'est le cas, un titrage avec une solution de thiosulfate de sodium (0,5 N) est réalisé jusqu'à ce que la coloration violette disparaisse. Un essai à blanc est effectué en suivant le même mode opératoire.

• Indice d'iode

La quantification de l'insaturation globale des acides gras peut être déterminée par une réaction d'addition, en fixant les halogènes (en excès). Les halogènes non fixés sur les doubles liaisons sont détruits lors de l'ajout d'une solution d'iodure de potassium pour former le diiode.

L'indice d'iode (I_I) est le nombre de gramme d'iode fixé par 100 grammes de corps gras [9], et est calculé par la relation suivante :

$$I_{I} = \frac{c_{S_2o_3} \times (V_b - V_E) \times M_{I_2} \times 100}{2 \times m_b}$$

<u>Où</u> Cs203:représente la concentration de thiosulfate en mole par litre.

V_b: représente le volume de thiosulfate pour blanc en millilitre.

V_E : représente le volume de thiosulfate en millilitre.

M₁₂: représente la masse molaire d'I₂ en grammes par mole.

mh: représente la masse d'huile exactement pesée en grammes.

Protocole:

On introduit une masse de 0.2 g de l'extrait huileux dans un erlenmeyer de 100 mL. Puis, 25 ml de cyclohexane et 10 ml de réactif de **WIJS** 0,1 M (ICl dans l'acide acétique) sont ajoutés successivement. Le tout est porté sous agitation à l'obscurité pendant 1 heure.

Ensuite, 100 ml d'eau distillée et 15 ml d'iodure de potassium sont introduits, et l'agitation est maintenue pendant quelques minutes. On réalise un dosage avec une solution de thiosulfate de sodium (0,1 M) jusqu'à ce que la coloration devienne pâle. Deux gouttes de l'empois d'amidon (indicateur coloré) sont ajoutées puis on continue le dosage jusqu'à disparition de la couleur bleue. On effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions.

1.2.3 Valorisation des acides gras de l'extrait huileux

Les corps gras sont en général des triesters du glycérol et d'acides gras, d'où il existe plusieurs méthodes pour les isoler. Notre but est d'isoler les acides gras de notre extrait huileux, les transformer en esters méthyliques d'acides gras (EMAG) en utilisant deux méthodes différentes puis les quantifier par la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

1.2.3.1 Préparation des EMAG par transestérification

La transestérification est une réaction catalysée par un acide ou une base en faisant agir un alcool (en excès) sur l'extrait huileux [10]. Elle est équilibrée, d'où trois molécules d'alcool s'échangent successivement contre une molécule de glycérol. Ce dernier se sépare du reste de la molécule des AG (triglycéride) qui se transforment en EMAG.

Schéma 2. Réaction de transestérification

Protocole:

0.4 g de l'extrait huileux sont pesés dans un monocol de 250 mL muni d'un réfrigérant et une garde à CaCl₂. On y ajoute 15 mL de solution méthanolique de trifluorure de bore (10 %) et on porte le tout à reflux pendant 20 minutes. Dès que le chauffage est arrêté, on verse un volume d'environ 10 mL d'eau distillée.

Après refroidissement, les EMAG sont extraits avec du chloroforme (3×25 mL). La phase organique est lavée à l'eau pour faire disparaitre toutes les traces d'alcool et du catalyseur puis séchée avec le Sulfate de Sodium. Ensuite, le chloroforme est chassé à l'aide de l'évaporateur rotatif.

1.2.3.2 Préparation des EMAG par saponification

La préparation des EMAG est réalisée en trois étapes consécutives : saponifier les lipides, libérer les AG puis les estérifier.

> Saponification des lipides

La saponification est une réaction thermique au cours de laquelle les triglycérides du corps gras sont hydrolysés en milieu alcalin par l'hydroxyde de potassium. Après décantation, deux fractions sont apparues : la fraction des insaponifiables et la fraction des saponifiables constituées du glycérol et un mélange de carboxylates de potassium (le savon).

Schéma 3. Réaction de saponification

Protocole:

On ajoute dans un ballon de 250 mL contenant déjà 0.4 g de l'extrait huileux, 50 ml d'une solution éthanolique de potasse (2N), puis on porte à reflux pendant 2 heures.

Après refroidissement, on ajoute 100 ml d'hexane et 100 ml d'eau distillée, ensuite on sépare par décantation la phase aqueuse contenant les savons et la phase organique contenant les insaponifiables.

Libération des AG

Pour récupérer les AG, il faut acidifier la phase aqueuse issue de la saponification par un acide concentré.

RCOO,
$$k^{\dagger}$$
 + HCl \longrightarrow RCOOH + k^{\dagger} , Cl $\stackrel{-}{}$ Acide gras

Schéma 4. Réaction acido-basique pour l'obtention des acides gras

Protocole:

On ajoute à la phase aqueuse une solution d'acide chlorhydrique (38%) jusqu'à l'obtention d'un pH égale à deux. À l'aide d'une ampoule à décanter, les AG sont extraits à l'hexane puis se sont récupérés après évaporation.

> Transformation des AG en EMAG

La réaction d'estérification est une condensation d'un groupement acide carboxylique (-COOH) et un groupement alcool (-OH) pour l'obtention d'une fonction ester (-COOR) avec élimination d'une molécule d'eau. Cette réaction nécessite un catalyseur acide, pour cela on a utilisé deux catalyseurs différents ; le premier est un acide fort et le deuxième est un acide de Lewis.

Schéma 5. Réaction d'estérification des acides gras

<u>Protocole 1:</u> Estérification par le méthanol en présence d'acide chlorhydrique (HCl)

On dissout 0.4 g d'AG dans 25 mL d'une solution de méthanol chlorhydrique (3%), ensuite on porte le tout à reflux pendant 1 heure.

Après refroidissement, l'extraction se fait à l'hexane (3×25 mL) et la phase organique contenant les EMAG est lavée trois fois à l'eau distillée, séchée avec le Sulfate de Sodium et évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Protocole 2: Estérification par le méthanol en présence de trifluorure de bore (BF₃)

Dans un ballon de 250 mL muni d'un réfrigérant et une garde à $CaCl_2$, on dissout 0.4 g d'AG dans un volume de 25 mL d'une solution méthanolique à 10% de trifluorure de bore.

Après un reflux de 1 heure, on laisse le mélange refroidir, puis on ajoute un volume d'eau égal au volume de la solution méthanolique de trifluorure de bore. Ensuite, la phase organique obtenue après extraction à l'hexane (3×25 mL) est lavée plusieurs fois avec de l'eau distillée, séchée en utilisant le Sulfate de Sodium et évaporée pour récupérer les EMAG.

1.2.3.3 Analyse des EMAG par CPG

La CPG est une technique chromatographique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexes de nature et de volatilités très diverses. Elle s'applique spécialement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans dégradation. Elle est très utile pour l'analyse des AG (estérifiés ayants des points d'ébullition moins élevés). La méthode possède plusieurs avantages toute comme la facilité en mise en œuvre, un temps d'analyse assez court, et la fiabilité des résultats.

Conditions opératoires:

L'analyse est faite à l'aide d'un chromatographe **SHIMADZU** modèle **GC 17-A**, instrument lié à un intégrateur enregistreur avec les conditions opératoires suivantes de la CPG/FID:

- ➤ Gaz vecteur : **N2** (Azote)
- > Type de colonne : colonne capillaire type **TR-CN100**
- > Structure de la colonne utilisée : Poly (bicyanopropyl) siloxane.

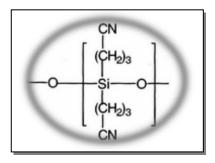


Figure 5. Structure du Poly (bicyanopropyl) siloxane

> Volume d'injection : 1 μl

➤ Température maximum de la colonne : 220°c.

> Température de l'injecteur : 250°c.

> Température du détecteur : 280°c.

➤ Longueur : 30m.

Diamètre intérieur : 0,25 mm.

> Epaisseur du film : 0,20μm.

➤ Vitesse du gaz vecteur : 34 cm/sec.

> Débit total du gaz vecteur : 25 mL/min.

➤ Débit du gaz vecteur dans la colonne : 1,5 mL/min.

➤ Mode d'injection : **Split.**

> Rapport split : 14 :1

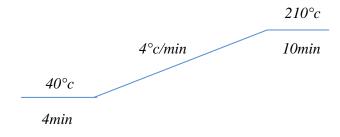
➤ Débit du gaz dans le split : 20 mL/min.

➤ Débit de la purge : 3 mL/min.

Fuite du septum : 2 mL/min.

> Pression: 600 kPa.

> La programmation de la température est faite comme suit :



Temps total de l'analyse : **60 min.**

1.2.4 Tests phytochimiques de la fraction des insaponifiables

Dans le but de détecter les fonctions principales de la fraction des insaponifiables, des tests

phytochimiques ont été mis en évidence.

• Stérols et Polyterpènes

Pour mettre en évidence les stérols et les polytèrpenes, on a utilisé la méthode décrite par

Liebermann [11].

Protocole:

Dans un tube à essai, on dissout à chaud 2 mg de notre échantillon dans 1 mL d'anhydride

acétique. Ensuite, on ajoute au triturât 0,5 mL d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'un

anneau pourpre et violet à l'interphase, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive.

Tocophérols

Les tocophérols sont identifiés en utilisant le test de Furter-Meyer [11].

Protocole:

On dissout environ 2 mg de l'échantillon dans 1 ml de chloroforme dans un tube à essai.

Une couleur bronze-rouge indique la présence des tocophérols.

1.3 Extrait méthanolique des graines d'anone

1.3.1 Obtention de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique des graines d'anone est obtenu par la même méthode d'extraction

utilisée pour obtenir l'extrait huileux (1.2.1) en changeant le solvant.

À l'aide d'un extracteur au Soxhlet, 20 g du broyat des graines sont extraites pendant 8

heures dans le méthanol (96%). Ensuite, le solvant est évaporé à sec et le résidu obtenu est pesé.

Le rendement de cette extraction est calculé par la relation suivante :

 $R=\frac{m_1}{m_0}\times 100$

<u>Où</u> **m**₀: représente la masse en grammes de la matière végétale.

m₁: représente la masse en grammes du résidu obtenue.

1.3.2 Tests phytochimiques de l'extrait méthanolique

• Stérols et Polyterpènes

Pour mettre en évidence les stérols et les polytèrpenes, on a utilisé la méthode de LIEBERMANN déjà décrite dans **1.2.4.**

Polyphénols

La présence des polyphénols est validée par une réaction au chlorure ferrique (FeCl3) [11].

Protocole:

Dans un tube à essai, on dissout 2 mg de l'échantillon puis on ajoute deux goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. L'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée, indique une réaction positive. Le témoin est effectué avec la solution alcoolique d'acide gallique.

Flavonoïdes

Une réaction qui s'appelle « la cyanidine » est utilisée pour mettre en évidence les flavonoïdes [11].

Protocole:

2 mg de l'extrait sont dissous dans 5 mL d'alcool chlorhydrique dilué 2 fois, puis on ajoute 2 à 3 copeaux de magnésium (réaction exothermique). Une coloration rose-orangée indique la présence de flavonoïdes.

1.4 Activité antioxydante

Dans la littérature, il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'activité antioxydante d'un échantillon, d'où on cite la méthode la plus connue qu'on a utilisée en travaillant avec le radical libre **DPPH•** (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) [12]. Ce dernier est un radical libre stable de couleur violacée qui montre un maximum d'absorbance à 517 nm qui disparaît après réduction par un composé antiradical. La mesure du pouvoir antioxydant se fait par spectrophotométrie à 517 nm en variant les concentrations des échantillons à tester.

Figure 6. Structure chimique du radical libre DPPH•

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH• à différentes concentrations (**IN%**) est calculé par la relation suivante [12] :

$$IN\% = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

<u>Où</u> Ac: représente l'absorbance du témoin négatif.

AT: représente l'absorbance des différentes concentrations.

La IC50 est déduite graphiquement à partir du graphe des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations, où elle représente la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH• [12].

Protocole:

Dans des tubes à essai, on prélève 4,5 mL de chacune des solutions méthanoliques des échantillons à testées (extrait huileux, extrait méthanolique) à différentes concentrations, en ajoutant 0,5 mL d'une solution méthanolique du DPPH (0.127 mg/mL). De la même manière, une solution est préparée pour le témoin négatif dont le méthanol remplace notre échantillon. Après incubation à l'abri de la lumière pendant 30 minutes et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La vitamine C est utilisée comme témoin positif dans cette expérience dans les mêmes conditions.

Chapitre 2 : Résultats et discussions

2.1 Composition biochimique des graines d'anone

Tableau 3. La composition biochimique des graines d'Annona cherimola

Composition biochimique des graines	Teneur en %
matière sèche	96.43
Humidité	3.57
Matière grasse (Lipides)	31.92

La teneur en eau des graines *d'Annona cherimola* est de **3.57%**. Cette valeur est relativement très faible, ce qui assure un bon stockage des graines d'où il y a une activité négligeable de l'eau qui est responsable des réactions d'altération.

Des études ont montré que lorsqu'on a une faible teneur en eau, on obtient un meilleur rendement en huile [13]. Le pourcentage élevé en matière grasse trouvé dans les graines *d'Annona cherimola* (31.92%) confirme cette dernière hypothèse.

2.2 Extrait huileux des graines d'anone

2.2.1 Extraction de l'huile (au Soxhlet)

Tableau 4. Caractéristiques de l'extrait huileux obtenu des graines d'Annona cherimola

Aspect	Couleur	Rendement (%)
Liquide limpide	Jaune	31.92

Le rendement en huile (extrait huileux) des graines *d'Annona cherimola* obtenu par Soxhlet est de **31.92%**; un rendement relativement élevé, qui fait de cette dernière un important potentiel dans les industries des huiles.

L'extrait huileux obtenu est un liquide limpide de couleur jaune et d'odeur très appréciée.

2.2.2 Propriétés physico-chimiques de l'huile des graines d'anone

Les résultats obtenus des analyses physico-chimiques sont représentés dans le **tableau 5**, ces derniers sont des outils pour déterminer la qualité d'une huile.

Tableau 5. Paramètres physico-chimiques de l'extrait huileux des graines d'Annona cherimola

Paramètres physico- chimiques	Valeurs
Densité à 20 ° C	0.903
Indice de réfraction à 20 ° C	1.474
Indice d'acide (mg de KOH /g d'huile)	2.53
Indice d'iode (g/100 g 'huile)	80.22
Indice de saponification (mg de KOH /g d'huile)	187.11
Indice de peroxyde (méqd'02/kg d'huile)	20.78
Indice d'estérification (mg de KOH/g d'huile)	184.58

> Propriétés physiques

• Densité relative

La densité relative est l'un des critères qui nous renseigne sur le groupe auquel appartient une huile et aussi sur la présence des corps étrangers (pureté).

La densité de l'extrait huileux des graines d'Annona cherimola est mesurée à une température de 20°C, ce qui nous a permis de la comparer à ceux de la littérature. La valeur de la densité trouvée dans cette étude est de l'ordre de **0,903**; valeur presque similaire à celle de l'huile d'olive (0,910) mais inférieure aux densités d'autres huiles réunies dans le tableau ci-dessous [14].

Tableau 6. Densités de quelques huiles végétales

Huiles végétales	Densité à 20°C
Olive	0,910
Argan	0,917
Maïs	0,919
Tournesol	0,920
Graines d'anone	0,903

La valeur de la densité nous donne information que notre huile appartient au groupe des huiles non siccatives, vu que cette dernière est comprise entre 0.900 et 0.920 [9].

Indice de réfraction

Comme la densité, l'indice de réfraction I_R nous renseigne sur la pureté et le groupe de l'huile.

Notre huile est classée comme non siccative avec un indice de réfraction de l'ordre de **1,474** à 20°C, ce dernier confirme le résultat de la densité relative.

L'indice de réfraction des huiles varie en fonction de leurs insaturations, d'où on les classe selon leurs composition en acide gras majoritaire (acide oléique, acide linoléique, acide linoléique) et leurs indice de réfraction (**tableau 7**) [15].

Différentes huiles	Indice de réfraction à 20°C	Classification des huiles
Olive	1,466-1,468	Huile riche en acide oléique 1,468 <r<1,472< td=""></r<1,472<>
Argan	1,471	
Nigelle	1,472	Huiles riches en acide linoléique
Sésame	1,470	1,471 <r<1,477< td=""></r<1,477<>
Graines d'anone	1,474	
Foie de morue	1,481	Huiles riches en acide linolénique 1,480 <r<1,523< td=""></r<1,523<>

Tableau 7. Indices de réfraction de quelques huiles

En se basant sur les résultats du tableau ci-dessus, on peut prédire que l'acide linoléique est un constituant majoritaire de l'extrait huileux des graines *d'Annona cherimola*.

> Propriétés chimiques

• Indice d'acide

L'indice d'acide I_R caractérise la pureté et la stabilité des huiles à la température ambiante.

L'indice d'acide de l'extrait huileux des graines d'Annona cherimola est de 2,53 mg KOH/g.

À titre comparatif, on donne les indices d'acide de quelques huiles végétales réunis dans le **tableau 8** [14].

 Huiles végétales
 Indice d'acide (mg KOH/g)

 Olive
 1-3

 Argan
 0,98-2,6

 Sésame
 4,74

 Tournesol
 0,4

 Graines d'anone
 2,53

Tableau 8. Indices d'acide de quelques huiles végétales

Une huile de bonne qualité possède un indice d'acide faible.

• Indice de saponification

L'indice de saponification **I**s nous renseigne sur la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras de notre huile.

La valeur révélée de l'indice de saponification trouvée dans cette étude est de l'ordre de **187,11 mg KOH/g**; valeur similaire à ceux de plusieurs huiles végétales comme ces résumés dans le **tableau 9** [14].

Huiles végétales	Indice de saponification (mg KOH/g)
Olive	185-200
Tournesol	188-194
Argan	189-193
Graines d'anone	187,11

Tableau 9. Indices de saponification de quelques huiles végétales

L'indice de saponification montre que l'extrait huileux des graines *d'Annona cherimola* contient des acides gras de chaines hydrocarbonées moyennes.

• Indice d'estérification

L'indice d'estérification I_E égal à l'indice de saponification pour les glycérides purs et il permet de déterminer la masse molaire des fractions majoritaires d'une huile (glycérides).

La valeur déduite de l'indice d'estérification de notre huile égale à **184,58 mg KOH/g**, une valeur plus ou moins moyenne qui implique que cette dernière peut être conservée plus longtemps.

• Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde **I**P nous renseigne sur l'état d'oxydation d'une huile, et un critère pour apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative.

Concernant notre extrait huileux des graines *d'Annona cherimola*, la valeur de l'indice de peroxyde est de l'ordre de **20,78 méq.d'02/kg**. Par rapport aux autres huiles végétales, cet indice semble être plus élevé.

Les indices de peroxyde de différentes huiles végétales sont résumés dans le **tableau 10** [10] [13] [14].

Tableau 10. Indices de peroxyde de quelques huiles végétales

Huiles végétales	Indice de peroxyde (méqd'02/kg)
Coloquinte	1,17
Pinus pinea	6,42
Pourghère	22,3
Graines d'anone	20,78

La valeur d'indice de peroxyde trouvée est supérieure à 10 méqd'O₂/Kg; Cela, veut dire que notre huile n'est pas riche en substances antioxydantes naturelles (tocophérols, polyphénols, caroténoïdes...).

• Indice d'iode

L'indice d'iode I_I est une caractéristique qui permet de mesurer le degré d'insaturation d'une huile.

L'indice d'iode de l'extrait huileux des graines d'Annona cherimola est de **80.22**; ce dernier est faible en comparant avec d'autres huiles végétales (**tableau 11**) [14].

Tableau 11. Indices d'iode de quelques huiles végétales

Huiles végétales	<i>Indice d'iode</i> (g/100 g 'huile)				
Olive	75-94				
Tournesol	120-134				
Argan	99-102				
Graines d'anone	80,22				

D'après la valeur d'indice d'iode trouvée dans cette étude, on peut prévoir de façon approximative que notre extrait huileux est riche en acides gras insaturés.

2.2.3 Valorisation des acides gras de l'extrait huileux

Avant de réaliser l'analyse par la CPG, nous avons d'abord procéder à une analyse infrarouge (IR) afin de vérifier l'obtention des EMAG.

2.2.3.1 Préparation des EMAG par transestérification

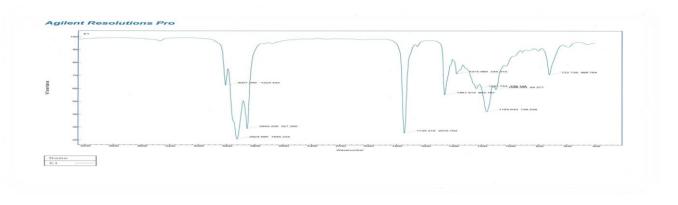


Figure 7. Spectre IR des EMAG préparés par transestérification

<u>Données spectrales</u>: 1745.42 cm⁻¹ (C=O ester), 1163.64 cm⁻¹ (C-O-C ester), 2854.20 cm⁻¹ et 2924.98 cm⁻¹ (C-H aliphatiques), 723.04 cm⁻¹ (chaine linéaire contient plus que quartes CH₂).

Vu l'absence de la bande OH caractéristique des acides (3400 cm⁻¹), on confirme la réussite de la transestérification des AG; de plus, la petite bande apparue en 724 cm⁻¹ nous informe que ces EMAG contiennent une longue chaine hydrocarbonée.

2.2.3.2 Préparation des EMAG par saponification

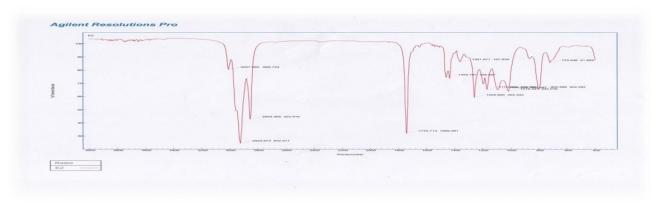


Figure 8. Spectre IR des EMAG préparées par saponification en présence de BF₃

<u>Données spectrales</u>: 1743.71 cm⁻¹ (C=O ester), 1170.66 cm⁻¹ (C-O-C ester), 2854.46 cm⁻¹ et 2925.67 cm⁻¹ (C-H aliphatiques), 722.72 cm⁻¹ (chaine linéaire contient plus que quartes CH₂).

Vu l'absence de la bande OH caractéristique des acides (3400 cm⁻¹), on confirme la réussite de l'estérification des AG en présence de BF₃; de plus, la petite bande apparue en 724 cm⁻¹ nous informe que ces EMAG contiennent une longue chaine hydrocarbonée.

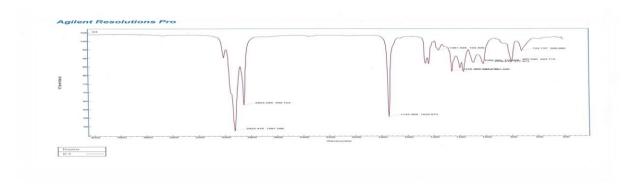


Figure 9. Spectre IR des EMAG préparées par saponification en présence de HCl

<u>Données spectrales</u>: 1743.57 cm⁻¹ (C=O ester), 1170.84 cm⁻¹ (C-O-C ester), 2854.46 cm⁻¹ et 2925.42 cm⁻¹ (C-H aliphatiques), 722.73 cm⁻¹ (chaine linéaire contient plus que quartes CH₂).

Vu l'absence de la bonde OH caractéristique des acides (3400 cm⁻¹), on confirme la réussite de la transestérification des AG en présence de HCl; de plus, la petite bande apparue en 724 cm⁻¹ nous informe que ces EMAG contiennent une longue chaine hydrocarbonée.

2.2.3.3 Analyse des EMAG par CPG

L'interprétation des chromatogrammes est basée sur un travail qui a été déjà réalisé au sein de notre laboratoire ; une base de données a été élaborée sur une vingtaine d'esters méthyliques. Les résultats de l'analyse sont représentés dans les **tableaux 12** et **13**.

Analyse des EMAG préparés par transestérification

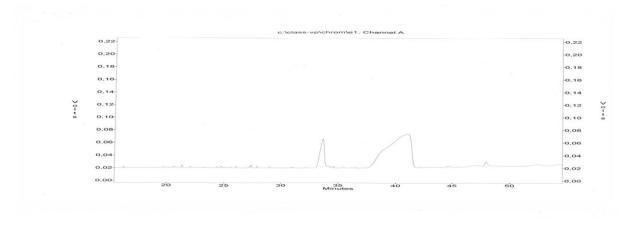


Figure 10. Chromatogramme des EMAG préparés par transestérification

Tableau 12. Identification des EMAG préparés par transestérification

EMAG	Nombre de carbone	Dénomination	Composition en AG	
			(%)	
Octanoate de méthyle	C8 :0	Acide caprylique	0,72%	
Décanoate de méthyle	C10 :0	Acide caprique	3,04%	
Laurate de méthyle	C12:0	Acide laurique	2,74%	
Tétradécanoate de méthyle	C14 :0	Acide myristique	2,81%	
Heptadécanoate de méthyle	C18:0	Acide stéarique	1,46%	
Inconnu	/	/	40,55%	
*Palmitoléate de méthyle	*C16 :1	Acide palmitoléique	32,03%	
Archidate de méthyle	C20 :0	Acide arachidique	4,65%	
*Archidonate de méthyle	*C20 :4	Acide arachidonique	11,98%	

❖ Analyse des EMGA préparés par estérification en présence de BF₃

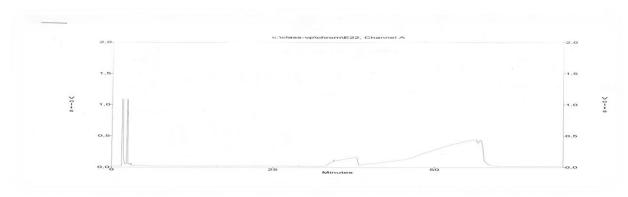
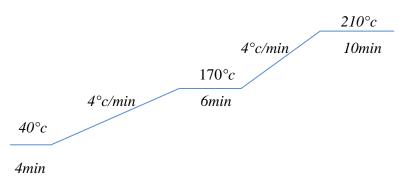


Figure 11. Chromatogramme des EMAG préparés par estérification en présence de BF₃

Vu que le chromatogramme des EMAG préparés par estérification en présence de BF₃ comporte deux grandes bosses, c'est-à-dire que la séparation n'a pas été faite correctement malgré que le spectre infrarouge nous a montré que la réaction d'estérification est réussite (l'absence de toutes traces d'acide), on a essayé de créer des nouvelles conditions d'analyse. Ce changement n'a concerné que le nombre de plateaux d'où la nouvelle programmation de la température est faite comme suit :



Malgré qu'on a changé les conditions opératoires, le même problème est apparu dans le chromatogramme (figure 12).

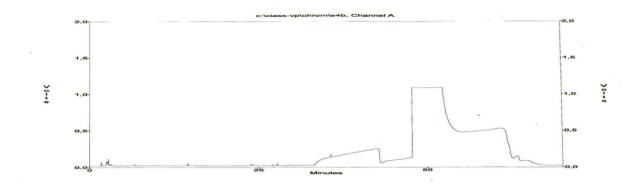


Figure 12. Chromatogramme des EMAG préparés par estérification en présence de BF₃ (après changement des conditions)

Malgré qu'on a changé les conditions opératoires, le même problème est apparu ; donc les EMAG n'ont pas pu être séparés lors de l'analyse du profil en acides gras par CPG par manque de standards ainsi que la non disponibilité d'un détecteur puissant tel que le détecteur à spectroscopie de masse MS.

❖ Analyse des EMGA préparés par estérification en présence de HCl

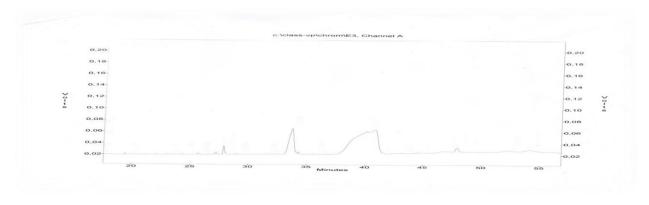


Figure 13. Chromatogramme des EMAG préparés par estérification en présence de HCl

Tableau 13. Identification des EMAG préparés par estérification en présence de HCl

EMAG	Nombre de carbone	Dénomination	Composition en AG	
			(%)	
Octanoate de	C9 .0	A side committees	2,67 %	
méthyle	C8 :0	Acide caprylique		
Décanoate de	G10.0	4 . 1	2,50%	
méthyle	C10 :0	Acide caprique		
Laurate de	G12 0	A · 1 1 ·	2 220/	
méthyle	C12 :0	Acide laurique	2,23%	
Tétradécanoate de	C14.0		6,28%	
méthyle	C14 :0	Acide myristique		
Pentadécanoate de	016.0	A 11 1 1.	1,66%	
méthyle	C16 :0	Acide palmitique		
Heptadécanoate de	C10. 0	A 11 // 1	2.050/	
méthyle	C18 :0	Acide stéarique	2,95%	
Inconnu	,	1	37,36%	
	,	/	,	
*Palmitoléate de	*C1.6. 1	A 11 1 1/2 1/2	20. 420/	
méthyle	*C16 :1	Acide palmitoléique	30,42%	
Archidate de	C20. 0	A ' 1 1 ' 1'	2.022/	
méthyle	C20 :0	Acide arachidique	2,83%	

*Linolénate de	*C10. 2	A ' 1 1' 12'	2.220/	
méthyle	*C18 :2	Acide linoléique	2,32%	
*Archidonate de	1.000		0.770/	
méthyle	*C20 :4	Acide arachidonique	8,75%	

L'extrait huileux des graines *d'Annona cherimola* contient plus d'AGI que des AGS avec des teneurs entre (41,49-44,01) % et (15,44-21,15) % successivement.

L'acide palmitoléique est l'acide gras insaturé majoritaire (30,42-32,03)% qui est un constituant rencontré généralement à des concentrations plus élevées dans le foie , suivi par l'acide arachidonique (8,75-11,98)%, suivi par l'acide linoléique (ω6) avec une proportion de 2,32%. Ce dernier est dit essentiel (AGPI) car il est nécessaire pour l'organisme, qui ne peut pas le synthétiser.

Les AGS trouvée dans notre huile (15,44-21,15)% sont représentés par l'acide caprylique (0,72-2,67)%, l'acide caprique (2,50-3,04)%, l'acide laurique (2,23-2,74)%, l'acide myristique avec une proportion entre 2,81 et 6,28%, l'acide palmitique 1,66%, l'acide stéarique (1,46-2,95)% et l'acide arachidique (2,83-4,65)%. Ces AG sont difficilement digestibles et constituent un facteur de risque pour la santé, car ils sont des agents des maladies cardiovasculaires.

Cette interprétation est faite en mettant à coté le gros pic qui est apparu vers les 40 min, un pic qui n'est pas séparé correctement (une bosse) pour des causes non apparues.

À titre comparatif entre le chromatogramme des EMAG préparés par transestérification et ceux préparés par estérification en présence de HCl, on constate une légère différence concernant les pourcentages des AG et aussi la présence de deux autres AG en plus dans le deuxième chromatogramme (EMAG préparés en présence d'un catalyseur) ; le premier AG est saturé (Acide palmitique) avec une proportion de 1,66% et le deuxième est l'acide linoléique qui est un AGI (2,32%).

Donc vu cette différence en composition des AG, on peut dire que la préparation des EMAG par estérification en présence d'un catalyseur (acide chlorhydrique) est mieux qu'une transestérification.

2.2.4 Etude de la fraction des insaponifiables

> Teneur en insaponifiables

La fraction des insaponifiables est obtenue par extraction liquide-liquide directement après traitement du corps gras par la potasse alcoolique.

La teneur en insaponifiables de l'extrait huileux des graines *d'Annona cherimola* est de l'ordre de **4,91%**; une teneur qui dépasse largement celle des autres huile végétales (**tableau14**).

Tableau 14. Teneur en insaponifiables de quelque huiles végétales

Huiles végétales	Teneur en insaponifiables (%)
Olive	1,5
Tournesol	0,4-1,4
Sésame	0,5-2,3
Argan	0,8-1,3
Graines d'anone	4,91

> Tests phytochimiques de la fraction des insaponifiables

Tableau 15. Tests phytochimiques de la fraction des insaponifiables

Familles	Tests	Résultats
Stérols et Polyterpènes	Liebermann	+
Tocophérols	Furter-Meyer	-

(+) : présence de la famille testée

(-): absence de la famille testée

2.3 Extrait méthanolique des graines d'anone

> Rendement d'extraction

Le rendement obtenu après extraction au Soxhlet de l'extrait méthanolique des graines d'Annona cherimola est de l'ordre de 25,22%.

> Tests phytochimiques de l'extrait méthanolique

Tableau 16. Tests phytochimiques de l'extrait méthanolique

Familles	Tests	Résultats
Stérols et Polyterpènes	Liebermann	+
Polyphénols	FeCl3	+
Flavonoïdes	Cyanidine	+

(+) : présence de la famille testé

(-): absence de la famille testé

2.4 Activité antioxydante

La mesure de l'activité antioxydante des deux extraits (hexanique et méthanolique) est effectuée par le test au radical DPPH, en réalisant une autre mesure dans les mêmes conditions pour l'acide ascorbique qui est utilisé comme référence.

Le mélange à tester contient 0.5 mL d'une solution méthanolique de DPPH (0,127mg/mL) et 4,5 mL des échantillons à différentes concentrations. L'absorbance est enregistrée à 517 nm, et les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution par rapport aux valeurs témoins.

Tableau 17. Activité antioxydante des extraits huileux et méthanolique

concentration mg/ml	2	1,5	1,25	1	0,5	0,25	contrôle
A (Extrait huileux)	0,198	0,215	0,256	0,288	0,308	0,317	0,328
A (Extrait MeOH)	0,031	0,035	0,051	0,110	0,192	0,290	0,321
A (vitamine C)	0,016	0,019	0,025	0,027	0,030	0,033	0,332
IN% (Extrait huileux)	39,63	34,45	21,95	12,19	6,09	3,35	/
IN% (Extrait MeOH)	90,34	89,09	84,11	65,73	40,18	9,65	/
IN% (vitamine C)	95,18	94,27	92,47	91,86	90,96	90,06	/

Les résultats de l'activité antioxydante de nos extraits et de l'acide ascorbique qui est utilisé comme référence sont représentés dans la **figure 14**.

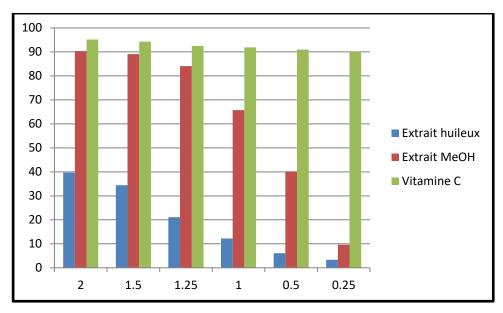


Figure 14. Activité antioxydante DPPH de l'extrait huileux, extrait méthanolique et la vitamine C

À titre comparatif, l'activité antioxydante de l'extrait huileux est largement faible par rapport à l'extrait méthanolique des graines *d'Annona cherimola*; de plus, ces derniers sont plus loin d'être des bons antioxydants, vu leurs pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• (IC₅₀) qui est très élevé pour l'extrait méthanolique (0,8 mg/mL) et qui n'existe même pas pour l'extrait huileux dans ces conditions (IN% le plus grand ne dépasse pas les 40%, donc on doit augmenter la concentration de notre extrait).

La faible activité antioxydante de l'extrait huileux est argumentée par l'absence de la famille des tocophérols ; une famille qui possède un pouvoir antioxydant très puissant [16]. De même, on peut aussi juger ce résultat en se basant sur la valeur de l'indice de peroxyde trouvée qui est supérieure à 10 méqd'O₂/Kg et qui veut dire que notre huile n'est pas riche en substances antioxydantes naturelles.

Concernant l'activité faible de l'extrait méthanolique, on peut prédire que, malgré les tests phytochimiques ont indiqué la présence de plusieurs familles qui sont de bons antioxydants naturels (polyphénols, Flavonoïdes...), peut être la teneur en ces substances est faible.

Conclusion générale

En égard à toutes les données rapportées dans la bibliographie concernant *l'Annona cherimola*, nous avons consacré le présent travail à faire une analyse chimique des graines de ce fruit.

Biochimiquement, les graines montrent qu'elle contient un taux de matière sèche aux enivrent de 96.43% et 3.57% de la teneur en eau et en matières volatiles (humidité).

Les graines d'*Annona cherimola* donnent un bon rendement en huile (extraction au Soxhlet) qui dépasse les 30% avec un temps d'extraction entre 6 et 8 heures.

Concernant l'analyse physico-chimique de notre huile, la densité, l'indice de réfraction, l'indice d'acide et de peroxyde ont révélés que cette dernière appartient au groupe des huiles non siccatives et sa peut être conservée longtemps. De plus, les valeurs des indices d'iode et de saponification révèlent respectivement que cette huile est riche en acide gras insaturés et contient des acides gras de chaines hydrocarbonées moyennes.

L'analyse de la composition de notre extrait huileux en acides gras par chromatographie en phase gazeuse, suivant des différentes méthodes pour la préparation des esters méthyliques d'acides gras, nous a montré la richesse en acides gras insaturé (majoritairement l'acide palmitoléique) en négligeant la bosse apparue dans les chromatogrammes.

Une caractéristique de l'extrait huileux des graines *Annona cherimola* est dans la teneur élevée en insaponifiables par rapport aux autres huiles végétales.

L'étude de l'activité antioxydante des deux extraits huileux et méthanolique des graines d'anone a montré une faible activité malgré que les tests phytochimiques concernant les familles qui ont un caractère antioxydant été majoritairement positives.

On note comme perspective à ce travail :

- Déterminer la teneur en cendre et en protéines des graines *Annona cherimola*.
- Analyser les esters méthyliques d'acides gras de l'extrait huileux par chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse (CPG/SM).
- Valoriser la comestibilité de notre huile par des études toxicologiques.
- Evaluer d'autres activités, telles que l'activité antimicrobienne, antifongique, etc...

Références

- [1]. Y.S.Park, H. Leontowicz, M. Leontowicz, J. Namiesnik, M. Suhaj, Milena Cvikrova, Olga Martincova, M. Weisz, S. Gorinstein. Comparison of the contents of bioactive compounds and the level of antioxidant activity in different kiwifruit cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (2011) 963–970.
- [2]. Monica R. Loizzo, Rosa Tundis, Marco Bonesi, Federica Menichini, Vincenzo Mastellone, Luigi Avallone, Francesco Menichini. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25 (2012) 179–184.
- [3]. Xavier SCHELDEMAN, thèse de Doctorat Ph.D; Université de GENT, Belgique, (2002).
- [4]. Arun Jyothi B, Venkatesh K, Chakrapani P and A Roja Rani. Phytochemical and Pharmacological potential of *Annona cherimola*-A Review. *International Journal of Phytomedicine*, 3 (2011) 439-447.
- [5]. Patricia Garcia-Salas, Ana Maria Gomez-Caravaca, Aranzazu Morales- Soto, Antonio Segura-Carretero, Alberto Fernandez-Gutierrez. Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of *Annona cherimola* and its by-products by HPLC-DAD-ESIQTOF- MS. *Food Research International*, 78 (2015) 246–257.
- [6]. Thierno Diatta, Contribution à l'étude de la qualité des corps gras alimentaire commercialisés au Sénégal. *Thèses de doctorat en pharmacie* (1998).
- [7]. L.G.Wade, JR., Organic chemistry. Eight edition, 1201.
- [8]. M FAYE, M., Nouveau procédé de fractionnement de la graine de Neem Sénégalais. *Thèse de Doctorat*, Université de Toulouse, Sciences des Agroressources (2010).
- [9]. Wolf, J. Manuel d'analyse des corps gras. Azoulay, France, (1968).
- [10]. Aliou ousman H., Valorisation d'une huile végétale tropicale: l'huile de pourghère. *Mémoire de magister*, université de sherbrooke, Canada, Génie chimique (1996).
- [11]. Alain dit Philippe Bidie, Banga B. N'guessan, Adou F. YAPO, Jean David N'guessan & Allico Joseph Djaman. « Activités antioxydantes de dix plantes medicinales de la pharmacopée ivoirienne ». *Sciences & Nature*, 8 (2011) 1 11.
- [12]. Luciana L. Mensor, Fabio S. Menezes, Gilda G. Leitao, Alexandre S. Reis, Tereza C. dos Santos, Cintia S. Coube and Suzana G. Leita. « Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method ». *Phytother*, 15 (2001) 127–130.
- [13]. Benseghier.K, Khamed.O, « Huiles Alimentaire de graines Pinus pinea Extraction et Caractérisation physique-chimique ». *Thèse de Doctorat*, Université Kasdi Merbah, Ouargla, (2014).
- [14]. Mostefa-Kara I., Contribution à l'étude de l'analyse de l'huile de *Ciittrullus colocynthis* (Coloquinte) et de son pouvoir antimicrobien. *Mémoire de magister*, université Abu-bakr Belkaid, Tlemcen, Substances Naturelles, Activité Biologique et Synthèse (2011).
- [15]. Ollé M., Analyse des corps gras. Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation, 5 (2002).
- [16]. Afaf kamel-Eldin, Lars-Ake appelkvist. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31 (1996) 671–701.

ملخص:

القشطة (Annonacherimola) هي ثمرة اصولها غريبة و قد اشتهرت مؤخرا بسبب طعمها اللذيذ ، قيمتها الغذائية، واستخدامها في الطب التقليدي. خلال هذه الدراسة، تم إجراء التحليل الكيميائي لزيت بذور هذه الفاكهة للمساهمة في تقدير أفضل لهذه الزيت. كميا، أظهر تحليل الأحماض الذهنية بواسطة آلة تبخر الغازات (GC) أن حمض البالمتيوليك يشكل جزءا رئيسيا من الأحماض الذهنية (AG) لهذه الفاكهة. علاوة على ذلك، من ناحية الجودة، أظهرت نتائج النشاط المضاد للأكسدة لكل من مقتطفات البذور قوة مضادة للأكسدة غير مؤثرة.

Résumé:

L'anone (*Annona cherimola*) est un fruit exotique indigène qui a suscité ces dernières décennies un intérêt croissant en raison de son goût savoureux, sa valeur nutritive et son utilisation dans la médecine traditionnelle. Dans cette étude, une analyse chimique de l'huile des graines de ce fruit a été faite pour contribuer à une meilleure appréciation de cette huile. Quantitativement, l'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG) a montré que l'acide palmitoléique constitue la majeure partie des AG de ce fruit. D'autre part, du point de vue qualité, les résultats de l'activité antioxydante des deux extraits, huileux et méthanolique, ont montré un faible pouvoir antioxydant des graines d'anone.

Abstract:

The annona (*Annona cherimola*) is a native exotic fruit that has aroused these last decades a growing interest due to its flavor, its nutritional value and its use in the traditional medicine. In this study, a chemical analysis of the oil from the seeds of this fruit was made to contribute to a better appreciation of this oil. Quantitatively, the analysis of fatty acids by gas chromatography (GC) has shown that the palmitoleic acid constitutes the major part of FA (fatty acids) of this fruit. On the other hand, from the point of view quality, the results of the antioxidant activity of the two extracts, oily and methanolic, showed a low antioxidant power of *Annona cherimola* seeds.