

## Screening phytochimique de deux variétés de pamplemousse: citrus paradisi yellow et blood

### [ Phytochemical screening of two grapefruit varieties: citrus paradisi yellow and blood ]

*Bahia BOUABID<sup>1</sup>, Ouafae EL YAHYAOU<sup>1</sup>, Amal SAMMAMA<sup>1</sup>, Saloua KERROURI<sup>1</sup>, Lella OULD ABDELLAHI<sup>1</sup>, Nabil AIT OUAZIZ<sup>2</sup>, L. Aicha LRHORFI<sup>1</sup>, Ali QUYOU<sup>2</sup>, and Rachid BENGUEDDOUR<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Laboratoire de Biochimie, Biotechnologies et Santé et Environnement, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université Ibn Tofail, Kenitra, Maroc

<sup>2</sup>Département de Biologie, Faculté des sciences, Université Ibn Tofail, Kenitra, Maroc

---

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** Citrus fruits and juices are an important source of bioactive compounds; called secondary metabolites, including phenolic and non-phenolic compounds. Several studies have demonstrated the antioxidant properties of these citrus fruits. Grapefruit, Citrus paradisi scientifically called is one of these citrus essentially consumed for its medical and antioxidant properties due to the presence of flavonoids, vitamin C and tannins. Characterization of two varieties of grapefruit, namely; citrus paradisi yellow and blood, was carried out through a phytochemical screening. The results obtained showed the presence of tannins, flavonoids, derivatives of anthracene, quinones, several other secondary metabolites that can be responsible for important therapeutic properties and use answered in the medical and cosmetic fields.

**KEYWORDS:** phytochemical screening, phenolics compounds, secondary metabolites, Grapefruit, Citrus paradisi yellow and blood.

**RESUME:** Les agrumes et leurs jus sont une source importante de composés bioactifs; appelés métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques et non phénoliques. Plusieurs études ont démontré les propriétés antioxydantes de ces agrumes.

Le pamplemousse, scientifiquement appelé citrus paradisi est l'un de ces agrumes consommée essentiellement pour ses vertus médicales et antioxydantes dues à la présence de flavonoïdes, de vitamine C et tanins.

Une caractérisation de deux espèces de pamplemousse, à savoir ; citrus paradisi yellow et blood, a été effectué par le biais d'un screening phytochimique. Les résultats obtenus ont démontré la présence de tanins, de flavonoïdes, de dérivés anthracéniques, de quinones, de plusieurs autres métabolites secondaires qui peuvent être à l'origine de propriétés thérapeutiques importantes et une utilisation répondu dans les domaines médicales et cosmétiques.

**MOTS-CLEFS:** criblage phytochimique, composés phénoliques, métabolites secondaires, pamplemousse, citrus paradisi yellow et blood.

## 1 INTRODUCTION

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore

mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la co- évolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires. [1]

Si leur rôle écologique reste encore à préciser, leur utilisation par l'homme dans de nombreuses préparations thérapeutiques est très largement répandue. La pharmacognosie est étymologiquement la connaissance (gnosis) des poisons (pharmacon) d'origine naturelle. Ces substances toxiques possèdent, parfois à faible dose, des propriétés médicamenteuses et peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques. Les molécules naturelles responsables de ces activités servent aujourd'hui de modèle à la créativité des chimistes qui tentent d'en améliorer les activités ou d'en diminuer les effets secondaires et la toxicité. Par ailleurs, les limites entre plantes médicinales et aliments sont parfois peu nettes, et un champ d'application nouveau, la «nutraceutique», exploite ce fait.[1]

La diversité des espèces utilisées et des métabolites secondaires déjà isolés laisse présager de l'ampleur de ce qui reste à découvrir. On considère effectivement que, jusqu'à ce jour, moins de 10 % des espèces de végétaux supérieurs qui peuplent actuellement la planète ont été explorées pour leurs propriétés chimiques et biologiques.[1]

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine. [1]

Plusieurs études ont prouvé les propriétés médicinales ; anti-inflammatoires, antibactériennes et antiseptiques de ces métabolites secondaires.

- Le pamplemousse, surtout consommé sous forme de jus auquel l'amertume confère des qualités désaltérantes ; il contient, outre que la vitamine C, de nombreuses substances antioxydantes complexes ; le lycopène, les limonoïdes et la naringine [2] ; un flavonoïde rarement présent dans les agrumes et très précieux dans la lutte contre les radicaux libres.
- Il renferme aussi de grandes quantités de pectine [2] ; et de tanins actifs hydrolysables [3].

Ainsi la présence de flavonoïdes, de limonades, de vitamine C et de caroténoïdes confère au pamplemousse des effets bénéfiques dans la prévention des cas de cancers de la bouche, du pharynx, de l'oesophage et de l'estomac [4]

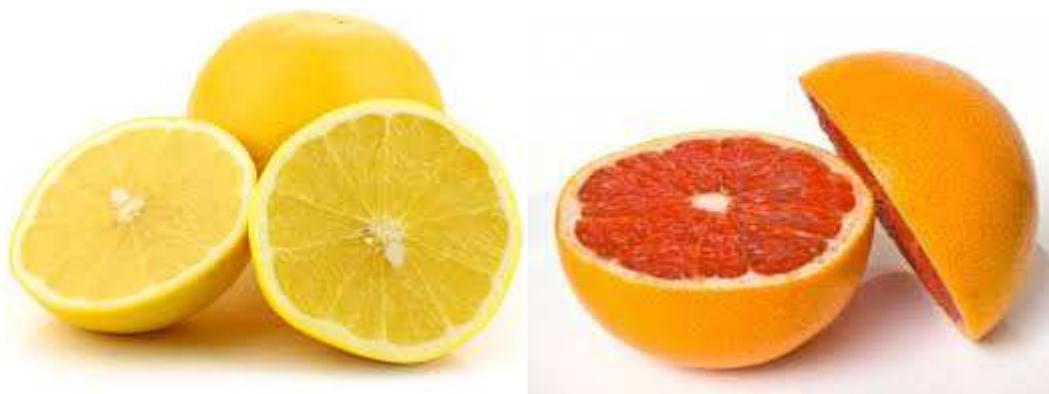
En vue d'une caractérisation phytochimique de métabolites de deux espèces de pamplemousse, à savoir ; citrus paradisi yellow et blood, un screening phytochimique est élaboré pour la recherche de tanins, flavonoïdes, dérivés anthracéniques, quinones libre, alcaloïdes, stérols et terpènes, sucres réducteurs, saponines, et d'autres métabolites secondaires.

## **2 MATERIEL ET METHODES**

### **2.1 PREPARATION DES ECHANTILLONS**

Les fruits testés ont été récoltés au niveau d'une ferme exemplaire située dans la région du rabat-salé-kénitra, province de kénitra- lgharb.

Deux espèces de pamplemousse ; citrus paradisi yellow et blood ont été prélevées aléatoirement, lavées et découpées en rondelles. Elles ont été par la suite séchées et broyées afin d'obtenir une poudre fine utilisable pour le criblage phytochimique.



*Fig. 1. Image des deux variétés du pamplemousse testées*

## 2.2 SCREENING PHYTOCHIMIQUE

### 2.2.1 CARACTÉRISATION DES TANINS

Les poudres de notre matériel végétal ont été préparées sous forme d'infusion dans 100ml d'eau distillée bouillante. Après 15 min, l'infusé est filtré et rincé dans une fiole jaugée de 100ml à l'eau distillée chaude, le volume est ajusté jusqu'au trait de jauge. La même préparation va nous servir pour caractériser différents types de flavonoïdes.

15 ml du réactif de Stiasny dans 30 ml de l'infusé a pu montrer la présence des tannins galliques. Après 15 min de chauffage au bain marie à 90°C, le mélange est filtré et saturé par 5g d'acétate de sodium. 1 ml d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  à 1% a été ensuite ajouté. La présence de tanins galliques est indiquée par l'apparition d'une teinte bleu-noire.

1 ml de HCl concentré a été ajouté à 5 ml de l'infusé. Le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes. La formation d'un précipité rouge insoluble dans l'alcool iso-amylique montre la présence de tanins catéchiques. [5]

### 2.2.2 CARACTÉRISATION DES FLAVONOÏDES

L'infusé préparé au préalable va nous servir pour caractériser les flavonoïdes. 5 ml de cet infusé a été ajouté à 5 ml d'alcool chlorhydrique (HCl concentré à 50% dans l'éthanol) et 1 ml d'alcool iso-amylique avec quelques morceaux de magnésium. Une coloration rose-orange (flavones) ou rose violacée (flavonones) indique la présence de flavonoïdes libres. [5]

La même réaction à la cyanidine citée précédemment mais sans ajout de morceaux de magnésium permet de montrer la présence des anthocyanines. Après 15 minutes de chauffage au bain marie, l'apparition d'une coloration rouge-cerise caractérise la présence des leucoanthocyanes (flavonols et flavanonols) alors qu'une coloration brun-rouge montre la présence des catéchols. [5]

Les anthocyanes ont été montrés par ajout à 5 ml du même infusé à 5 ml d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) à 10% et 5 ml d'ammoniaque ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) à 50%. La coloration de l'infusé s'accroît par acidification puis vire au bleu en milieu basique en présence d'anthocyanes. [5]

### 2.2.3 CARACTÉRISATION DES STÉROLS ET POLYTERPÈNES

1g du matériel végétal est nécessaire pour préparer un macéré dans 20ml de l'éther pendant 24 heures dans un flacon en verre fermé. Ce macéré sert à la fois pour caractériser les stérols et polyterpènes, les caroténoïdes et les coumarines [5]

1ml de  $\text{CHCl}_3$  est ajouté au résidu de 10ml du macéré évaporé. La solution obtenue est partagée dans deux tubes à essai. 1 à 2ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  est ajouté au 1<sup>er</sup> tube, le deuxième servira de témoin. La présence des stérols et polyterpènes est révélée par la formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet au niveau de la zone de contact des deux solutions. [5]

#### 2.2.4 CARACTÉRISATION DES CAROTÉNOÏDES

2 à 3 gouttes du trichlorure d'antimoine saturé dans le chloroforme sont ajoutées au résidu de 5ml du macéré évaporé à sec. Une coloration bleue devenant rouge indique la présence des caroténoïdes [5].

#### 2.2.5 CARACTÉRISATION DES COUMARINES

- **1<sup>ère</sup> méthode**

4 ml de la solution éthanolique 5% est réparti dans deux tubes à essai. On ajoute à l'un des tubes 0,5 ml de NaOH à 10%, l'autre tube sert de témoin. Puis les deux tubes à essai sont chauffés au bain-marie jusqu'à ébullition. Après refroidissement, on ajoute dans chaque tube à essai 4 ml d'eau distillée. Si le liquide du tube à essai dans lequel l'on a ajouté la solution alcaline est plus clair par rapport au liquide du tube à essai témoin (sans solution alcaline), alors la réaction est positive. En acidifiant la solution transparente avec quelques gouttes de HCl concentré, elle perd sa coloration jaune, se trouble ou forme un précipité [6].

- **2<sup>ème</sup> méthode**

5ml de l'extrait éthéré sont évaporés à sec. Les résidus sont repris dans 2ml d'eau chaude et 1ml de NH<sub>4</sub>OH à 25%. L'observation sous UV à 366nm d'une fluorescence bleue intense indique la présence qualitative des coumarines [5].

#### 2.2.6 CARACTERISATION QUANTITATIF DES SAPONINES : INDICE DE MOUSSE

1g du matériel végétal réduit en poudre dans à 100ml d'eau distillée bouillante permet d'obtenir un décocté à 1%. Ce dernier est ensuite mis au bain marie pendant 15 min à une température d'ébullition. Le décocté est ensuite filtré est réparti dans 10 tubes à essai de 1 à 10ml d'une manière successive. Le volume de chaque tube est complété à 10 ml par l'eau distillée. Chaque tubes est agité verticalement pendent 15 sec. La hauteur de la mousse est ensuite mesurée après 15min de repos. L'indice de mousse est calculé au niveau des tubes où la hauteur de la mousse est supérieure ou égale à 1cm selon la relation suivante :

$$I_m = 1000/N \quad (N : \text{numéro de tube dans lequel la mousse est de 1cm}) [5]$$

#### 2.2.7 CARACTÉRISATION DES SUCRES RÉDUCTEURS

2 g de poudre du matériel végétale de chaque plante sont macérées dans 15ml de méthanol pendant 48h dans un flacon en verre à fermeture afin d'éviter l'évaporation du solvant. 5ml du macéré filtré est ajouté à 5ml de la liqueur de Fehling et disposée dans un tube à essai (2,5ml de la solution A obtenue par l'ajout de 2g de SO<sub>4</sub>Cu à 50ml d'eau distillée et 2,5 ml de la solution B obtenue en dissolvant 7,5g de NaOH dans 50ml d'eau distillée puis ajouter 10g du Tartrate Na/K). Après le chauffage du tube au bain marie 2 à 3 min à 70°C, l'apparition d'un précipité rouge brique signifie la présence de composées réducteurs [6].

#### 2.2.8 CARACTÉRISATION DES ALCALOÏDES

2 g des drogues végétales de chaque plante ont été macéré dans 15 ml d'eau distillée pendant 24 heures dans les conditions climatiques ambiantes. Après filtration, le macéré de chaque échantillon est disposé dans un tube à essai pour être testé par le réactif de Dragendroff ; un deuxième tube à essai ; contenant de l'eau distillée et quelques gouttes du réactif ; est considéré comme témoin. La réaction est dite positive s'il y a formation d'un précipité de couleur orange-rougeâtre [7].

#### 2.2.9 CARACTÉRISATION DES QUINONES LIBRES

2g du matériel végétal sont macérés dans 20ml d'éther de pétrole. Après quelques minutes d'agitation, le mélange est laissé au repos pendant 12h. Quelques gouttes de NaOH 1/10 sont ajoutées à l'extrait d'éther de pétrole évaporé à sec. La présence de quinones libres est révélée par un virage de la couleur des phases aqueuses au jaune, rouge ou violet [8].

#### 2.2.10 TEST DE MUCILAGE

1ml du décocté des échantillons à 10% est additionné à 5ml d'éthanol absolu. La formation d'un précipité mousseux indique la présence de mucilage [5].

#### 2.2.11 RECHERCHE DE STUPÉFIANTS

Dans un tube à essai peser 0.5g de la poudre végétale et ajouter 5ml d'éther de pétrole. Après une agitation 15 min, filtrer le mélange et évaporer le filtrat à sec dans un bain-marie. 4 à 5 gouttes de KOH à 5% dans l'alcool sont ajoutées aux résidus. Une coloration violette montre la présence de stupéfiants de type tétrahydrocannabinols (réaction de BEAM) [9].

#### 2.2.12 CARACTÉRISATION DES PROTÉINES

La mise en évidence des protéines a été faite par la réaction du Biuret. 1g de la poudre végétale a été ajouté à 2 ml de NaOH aqueux à 20% dans un tube à essai, auxquels sont ajoutées 2 à 3 gouttes d'une solution aqueuse de  $\text{CuSO}_4$  à 2%. Une coloration violette, quelque fois teintée de rouge, indique une réaction positive [6].

#### 2.2.13 CARACTÉRISATION DES LIPOÏDES

2g du matériel végétal ont été macérés dans 15 ml d'éther du pétrole pendant 30 minutes. Le filtrat ainsi obtenu est évaporé. 3 gouttes de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ont été ajoutées aux résidus. L'apparition d'une forte coloration violette ou verte témoigne de la présence des lipoides (Etudes rwandaises, 1977) [7].

#### 2.2.14 CARACTÉRISATION DES HUILES ESSENTIELLES

10ml de l'extrait au dichlorométhane 1% ont été évaporés à sec. Le résidu est ensuite dissous dans 3 ml d'éthanol. La solution ainsi obtenue est à nouveau évaporée à sec. La sensation d'une odeur parfumée indique la présence d'huiles essentielles [10].

#### 2.2.15 CARACTÉRISATION DES IRRIDOÏDES

Un décocté est préparé en ajoutant 1g du matériel végétal à 20ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 1h. Après refroidissement du filtrat et évaporation, 1ml d'acide chloridrique concentré est ajouté aux résidus. Le test est dit positif s'il y a formation de précipité noirâtre après chauffage de la solution [8].

### 3 RESULTATS

Les résultats du criblage phytochimique effectué pour les deux espèces de pamplemousse sont rapportés au niveau du tableau suivant selon le degré de réactivité.

Tableau 1. Résultat du criblage phytochimique des deux variétés du pamplemousse

Groupes chimiques		variétés	Citrus paradisi yellow	Citrus paradisi blood
Tannins	Tannins libres		++	+++
	Tannins catéchiques		-	-
	Tannins galliques		-	-
Flavonoïdes	Flavones		-	-
	Flavanones		++++	++
	Leucoanthocyanes		-	-
	Anthocyanes		-	-
Dérivés anthracéniques	Anthracéniques libres		-	-
	Anthracéniques combinés	O-hétérosides	++	-
		O-hétérosides génines	-	-
		C-hétérosides	±	++
Quinones		-	++	
Alcaloïdes		++	++	
Stérols and terpènes		+++	++	
Sucres réducteurs		+	+	
Saponosides		-	-	
coumarines		++++	++++	
caroténoïdes		+++	+	
Huiles essentielles		+	+	
lipoïdes		+++	+	
stupéfiants		-	-	
Protéines		-	+	
irridoides		++++	+++	

++++: Strong positive reaction; ++: Moderately positive reaction; +++: positive reaction; +: weakly positive reaction; -: negative test

Au regard des résultats renseignés dans le tableau 1, les citrus paradisi yellow et blood renferment d'importants métabolites secondaires.

Une présence modérée de tanins est observée respectivement au niveau du citrus paradisi yellow et du citrus paradisi blood. En effet, le pamplemousse ; avec ces différentes espèces, contiennent bien des tanins hydrolysables [3].

Des flavonoïdes de types flavanones et des caroténoïdes ont été fortement remarquées au niveau du citrus paradisi yellow, mais leur présence est modérée chez le citrus paradisi blood. Les mêmes résultats sont cités au niveau des travaux de Fujioka K et al ;2006[4].

Une réaction fortement positive a été observée chez les deux espèces de citrus montrant la présence de coumarine et des irridoides.

Les protéines sont présentes chez le citrus paradisi blood contrairement au citrus paradisi yellow qui a montré une réaction négative

En revanche, une présence de quinones et de dérivés anthracéniques de type C-hétérosides est observée chez le citrus paradisi blood contrairement au citrus paradisi yellow. Les dérivés anthracéniques de type O-hétérosides sont observés uniquement chez le citrus paradisi yellow.

La formation d'un anneau rouge brunâtre témoigne d'une présence de stérols et terpènes chez les deux espèces de pamplemousse, néanmoins, le citrus paradisi yellow a montré une réactivité plus importante que celle observés chez le citrus paradisi blood.

Contrairement aux alcaloïdes ; métabolites moyennement présent chez les deux espèces testés, les sucres réducteurs sont faiblement observés chez les deux espèces de citrus.

Une réaction négative est notée pour le test des saponines et des stupéfiants chez les citrus paradisi yellow et blood.

#### 4 CONCLUSION

Dans le but d'une caractérisation phytochimique de deux espèces du pamplemousse (jaune et rouge, un screening phytochimique basé sur des réactions de coloration et/ou de précipitation a été effectué pour faire ressortir les différents métabolites secondaires.

En effet, cette étude a permis de mettre en évidence divers métabolites secondaires, à savoir, les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les dérivés anthracéniques, les caroténoïdes, les quinones et d'autres pouvant être à l'origine de l'activité antioxydante de ces deux espèces d'agrumes, d'où l'intérêt de leurs utilisations dans la phytothérapie traditionnelle ainsi que le domaine pharmacologique et cosmétique.

#### REFERENCES

- [1] Sabrina KRIEF « Métabolites secondaires des plantes et comportement animal surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda » thèse de doctorat, septembre 2003.
- [2] Effets métaboliques et interactions médicamenteuses provoqués par certaines substances d'origine végétale : pamplemousse, millepertuis et ail, La presse médicale 2002, vol. 31, n°30, pp. 1416-1422
- [3] J-J.Macheix, A.Fleuriet,C.Jay-Allemand. Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. PPUR. Lausanne. 191p.2005.
- [4] The effects of grapefruit on weight and insulin resistance: relationship to the metabolic syndrome, Fujioka K<sup>1</sup>, Greenway F, Sheard J, Ying Y. J Med Food. 2006 Spring; 9(1):49-54.
- [5] Mamadou Badiaga, « étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de NAUCLEA LATIFOLIA smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali », thèse de doctorat, Mali 2012, 92 p
- [6] Yves-Alain BÉKRO et al. Sciences & Nature Vol. 4 N°2 : 217 - 225 (2007)
- [7] Screening phytochimique de *Achillea Millefolium* L et *Bridelia Brideliifolia* et tests d'activité biologique sur *Escherichia Coli*, *Salmonella Polyvalento* et *Shigella Flexneri* par la méthode de tests antibiogrammes par Matenga Masumbuko-Institut supérieur pédagogique de Bukavu - Licence en pédagogie appliquée 1996
- [8] Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasum* L.)
- [9] Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (*Myrtaceae*). 2005
- [10] Criblage phytochimique et évaluation de la toxicité aigüe de *Pisolithus tinctorius* (basidiomycète). J. sci. pharm. biol., Vol.10, n°2 - 2009, pp.6-13