



Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante (Enhancement of the aqueous extract of the bark of *Punica granatum* fruit through the study of its antimicrobial and antioxidant activities)

S. Lairini¹, R. Bouslamti¹, F. Zerrouq² et A. Farah³

¹Equipe Bioindustrie et Technologie Alimentaire. Laboratoire Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire des Aliments (LASSA). Université Sidi Mohammed Ben Abdallah,

Ecole Supérieure de Technologie de Fès, Maroc.- B.P : 2427, Fès, Maroc.

²QHSE-RG, Laboratoire LCME, Ecole Supérieure de Technologie, BP 2427, Université SMBA de Fès

³Equipe de recherche: Agro-ressource & chimie fine. Laboratoire des Plantes Médicinales, Aromatiques et Substances Naturelles. Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques. BP. 159, Principal, 34000, Taounate, Maroc

Correspondance : lairinisanaa@yahoo.fr

Abstract

The aqueous extract of the bark of *Punica granatum* fruit of the north western region of Morocco (Taounate) is used to evaluate its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Penicillium expansum* and *Candidum Geotricum* diffusion of one part, and analyze both the rate of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu's antioxidant and the diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) secondly. The results of this study shows that the extract contains total polyphenols and 18µg/mg a remarkable antimicrobial effect from 0,12 mg / ml of extract for *Staphylococcus aureus* (inhibition diameter of $9,03 \pm 0,15$ mm) and *Listeria monocytogenes* ($9,30 \pm 0,12$ mm), 0,31 mg / ml for *E. coli* ($10,04 \pm 0,03$ mm) and *Geotricum Candidum* ($3,10 \pm 0,08$ mm) and 0,62 mg / ml for *Penicillium expansum* ($2,40 \pm 0,05$ mm)). Moreover, the test of the aqueous extract by DPPH shows anti-radical of about 87,43% activity and therefore extract from the bark of *Punica granatum* fruit has an important antioxidant.

Keywords: Enhancement, *Punica granatum*, antimicrobial activity, antioxidant activity, polyphenol aqueous extract.

Résumé

L'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* de la région nord ouest du Maroc (Taounate) est utilisé pour évaluer son activité antimicrobienne sur des *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Penicillium expansum* et *Candidum geotricum* par diffusion d'une part, et d'analyser à la fois le taux des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu's et le pouvoir antioxydant par le diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) d'autre part. Les résultats de cette étude montrent que l'extrait contient 18 µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait de l'écorce de *Punica granatum* et un remarquable effet antimicrobien à partir de 0,12 mg/ml d'extrait pour *Staphylococcus aureus* (diamètre d'inhibition de $9,03 \pm 0,15$ mm) et *Listeria monocytogenes* ($9,30 \pm 0,12$ mm), 0,31 mg/ml pour *E.coli* ($10,04 \pm 0,03$ mm) et *Candidum Geotricum* ($3,10 \pm 0,08$ mm) et 0,62 mg/ml pour *Penicillium expansum* ($2,40 \pm 0,05$ mm)). Par ailleurs, le test de l'extrait aqueux par DPPH montre une activité anti-radicalaire de l'ordre de 87,43% et par conséquent L'extrait de l'écorce de fruit de *Punica granatum* possède un pouvoir antioxydant important.

Mots clés : Valorisation, *Punica granatum*, activité antimicrobienne, activité antioxydante, polyphénol extrait aqueux.

1. Introduction

Par sa position géographique et sa diversité climatique, le Maroc recèle d'un patrimoine végétal important. Parmi ses ressources naturelles, les plantes aromatiques et médicinales (PAM) occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale.

Le grenadier ou le *Punica granatum* fait partie des espèces médicinales. C'est une espèce qui appartient à la famille de Punicaceae. C'est un arbre ou arbuste buissonnant de 2 à 5 m de hauteur, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux. Il croît majoritairement dans toute la région méditerranéenne, de façon spontanée ou cultivée [1]. Le fruit de grenadine (feuille, écorce et graine) est riche en composés phénoliques [2,3]. Cette composition lui a attribué plusieurs propriétés aussi bien dans le domaine médical que dans le

domaine agroalimentaire ; en effet des études ont confirmé que la grenade possède des propriétés antidiabétiques [4] anti-microbiennes [5] et anticancérigènes [6]. D'autres études ont montré que la grenade possède des propriétés antioxydantes et antimicrobienne contre la détérioration des produits alimentaires [7,8,9]. Cela justifie son utilisation comme agent de conservation naturel car actuellement, il y a tendance à substituer les agents chimiques et synthétiques ayant une activité anti-microbiologique et antioxydante par des agents naturels présents dans les fruits, les légumes et les herbes aromatiques [10]. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail, dont le but principal est de valoriser l'écorce de fruit de grenadine en étudiant ses propriétés antimicrobiennes et antioxydantes.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel végétal

La collecte de l'échantillon de l'écorce du fruit de *Punica granatum* a été effectuée au Maroc dans la région de Taounate au cours du mois d'octobre 2012. Il a ensuite été séché puis broyé, La poudre obtenue est conservée à l'abri de l'humidité et de la lumière.

Préparation de l'Extrait

La préparation de l'extrait aqueux de l'écorce de *Punica granatum* a été effectuée par la méthode d'infusion. Plusieurs concentrations ont été préparées à partir de la poudre obtenue (0,03 - 0,06 - 0,09 - 0,12- 0,15 - 0,31 - 0,46 - 0,62 et 1,25 mg /ml) dans de l'eau bouillante, macérées pendant 2h sous agitation, les échantillons ont ensuite été filtrés (porosité de filtre : 0.22µm) et les filtrats conservés à 4°C.

2.2. Méthodes

2.2.1. Analyses des polyphénols.

Le dosage des polyphénols dans l'extrait aqueux de *Punica granatum* a été réalisé par une analyse qualitative par chromatographie sur couche mince et une analyse quantitative par un dosage colorimétrique.

L'analyse chromatographique sur couche mince (CCM) de l'extrait a été effectuée par un système de séparation BAW (Butanol/Acide acétique/Eau: 60/15/35). L'acide gallique a été utilisé comme standard à une concentration de 20mg d'acide gallique/100ml.

5 µl de chaque extrait et du standard, ont été déposés et les plaques introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par la vapeur de la phase mobile. Après migration, les plaques ont été séchées, puis visualisées par un système de révélation physique sous UV à 254nm [11].

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin- Ciocalteu's [12]. A 0.5 ml d'extrait sont ajoutés successivement 0.5ml d'eau distillée, 0.5 ml de réactif de Folin- Ciocalteu's, et 0.5 ml de carbonate de sodium à 20 %. L'ensemble est incubé pendant une heure à température ambiante à l'abri de la lumière.

Une gamme d'étalonnage a été réalisé en utilisant une solution mère d'acide gallique de 0,02mg/ml. La lecture des absorbances a été effectuée à 760 nm. La concentration en composés phénoliques totaux a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage.

Le dosage a été répété trois fois.

2.2.2. Activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait obtenu de *Punica granatum*, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les boîtes coulées par la gélose nutritive et Sabouraud respectivement pour les bactéries et les moisissures sont ensemencées avec 20 µl de culture liquide préparé dans le bouillon nutritif à 10⁹ ufc/ml. Des disques stériles de papier wattman de 6mm de diamètre sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur gélose et imprégnés de 10 µl de l'extrait. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à l'étuve à température de 37°C pendant 18 à 24h pour les souches bactériennes et les champignons à 30°C pendant 48h. Un témoin a été réalisé en ensemencant une boîte de Pétri contenant le milieu convenable pour la croissance de germes à tester. Les analyses sont répétées trois fois et Le diamètre d'inhibition qui traduit l'activité antibactérienne a ainsi été déterminé.

Les micro-organismes utilisés pour la détermination de cette activité antimicrobienne sont : **Bactéries: *E. coli*** (ATCC 25922) et ***S.aureus*** (ATCC 25923), collectées du laboratoire de biotechnologie microbienne de la faculté des sciences et techniques de Fès, ***Listeria monocytogenes*** [13], provient du Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu, Direction Régionale de la Santé, Hôpital EL Ghassani-Fès, Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance.

Moisissures : *Penicillium expansum* (ATCC 24692) et *Geotrichum candidum* (ATCC 7340). Elles sont cultivées sur le milieu nutritif Sabouraud.

2.2.3. Activité anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire de l'extrait a été étudiée selon la méthode basée sur la réduction de DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) par les antioxydants selon le protocole décrit par [14]. Après avoir solubilisé 5mg de DPPH dans 25ml d'éthanol absolu, 3 tubes ont été préparés séparément :

- Echantillon : 0,4 ml DPPH + 100µl d'extrait + 1.5ml éthanol absolu
- Contrôle négatif : 0,4ml DPPH + 1,6ml Ethanol
- Contrôle Blanc : 100µl d'échantillon + 1.9 d'éthanol absolu.

Après agitation, les tubes ont été placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm. Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire, selon la réaction suivante :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = [(AbsC - Abs \text{ éch}) / Abs C] \times 100$$

Où : Abs éch : absorbance de l'échantillon.
Abs Contrôle : absorbance du contrôle.

3. Résultats et discussion

3.1. Analyse des polyphénols

Le résultat de la CCM a été obtenu après 20min de migration de l'extrait sur la plaque de silice, les taches formées par l'extrait de *Punica granatum* ont montré le même niveau de migration que celui formé par l'acide gallique (RF = 0,66) ce qui suggère la présence des polyphénols. La concentration des polyphénols a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage préalablement établie. Elle est de 18 µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait de l'écorce de *Punica granatum*.

Ces résultats corroborent celui de Fournier et al., [2] qui a montré que l'écorce de fruit de *Punica granatum* est riche en tannins et en polyphénols par rapport aux autres organes du même fruit et peut contenir jusqu'à 28% de ces mêmes composés.

3.2. Activité antimicrobienne

Les résultats ci-dessous montrent que l'activité inhibitrice des germes commence à partir de 0,12mg/ml d'extrait, les zones d'inhibition augmentent en fonction de l'augmentation de la concentration en extrait. Les diamètres des zones d'inhibitions varient de 2,40±0,05mm à 21,00±0,40mm.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'extrait aqueux de *Punica granatum* a un effet antimicrobien sur les bactéries et les moisissures testées, les bactéries Gram+ (*S.aureus*, *L.monocytogenes*) sont les plus susceptibles par comparaison avec les bactéries Gram- (*E.coli*); ceci peut être attribué à la différence de la structure entre les bactéries Gram+ et les bactéries Gram- [15].

Ces résultats corroborent ceux de Reddy et al., [16] qui ont démontré que des extraits de grenade présentent une activité antimicrobienne significative contre *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *S.aureus*, ceux de Al-Zoreky [17] qui a montré que les extraits de l'écorce de grenade constituent un puissant inhibiteur de la croissance de *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* et *Yersinia enterocolitica*, et ceux de Choi et al.,[18] qui ont étudié l'effet in vivo et in vitro de l'application de diverses concentrations d'extraits d'écorce de grenade pour inhiber la croissance de la Salmonelle, en constatant que la dose minimale était de 62,5 mg/l.

Cette activité antimicrobienne de cet extrait est due, au moins partiellement, à la présence des polyphénols. Cela est confirmé par d'autres recherches qui ont attribué l'activité antimicrobienne à la présence des polyphénols [19].

3.3. Activité anti-radicalaire

Les résultats de cette expérience obtenus révèlent que l'extrait de l'écorce de fruit de *Punica granatum* possède une activité antiradicalaire de l'ordre de 87,43% et par conséquent, le fruit possède une activité antioxydante importante, cette activité est attribuée à sa richesse aux composés phénoliques. En effet les travaux réalisés par Kang et al., [20] ont suggéré que les molécules polaires polyphénoliques présentes dans l'extrait végétal contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire et ceux de Seeram et al.,[21] ont démontré que les tiges et l'écorce du grenadier possèdent des propriétés antioxydantes très importantes.

Ces activités antimicrobienne et antioxydante de l'écorce de fruit de *Punica granatum* permettent l'utilisation de ce dernier comme agent de conservation naturelle dans plusieurs applications agroalimentaires ; en effet Navarro et al.,[7], Viuda-Martos et al.,[8] et Di Silvestro et al.,[9] ont démontré que l'utilisation de l'extrait de l'écorce de fruit de *Punica granatum* comme condiment alimentaire améliore la qualité organoleptique et hygiénique des produits agroalimentaires par son effet antioxydant et inhibiteur des microorganismes nuisibles.

Tableau 1. Zone d'inhibition (mm) des différentes concentrations (mg/ml) d'extrait de l'écorce du fruit de *Punica granatum*.

	3,12. 10 ⁻²	6,2. 10 ⁻²	9. 10 ⁻²	0,12	0,15	0,31	0,46	0,62	1,25
<i>E.coli</i>	0	0	0	0	0	10,04 ±0,3	12,00±0,20	16,01±0,10	18,02±0,38
	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++
<i>S.aureus</i>	0	0	0	9,03±0,15	10,05±0,22	10,03±0,16	11,12±0,12	13,00±0,20	16,04±0,32
	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>L.monocytogenes</i>	0	0	0	9,30±0,12	11,16±0,13	13,40±0,11	15,40±0,36	17,10±0,40	17,20±0,15
	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>G.candidum</i>	0	0	0	3,10±0,08	11,30±0,18	14,80±0,60	16,30±0,14	17,50±0,15	21,00±0,34
	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++
<i>P.expansum</i>	0	0	0	0	0	0	0	2,40±0,05	10,18±0,24
	-	-	-	-	-	-	-	++	+++

Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais

Conclusion

L'analyse qualitative de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* par chromatographie sur couche mince a montré, la présence des polyphénols totaux et l'analyse quantitative des polyphénols totaux a aboutit à un taux de 18µg/mg d'équivalent d'acide gallique par milligramme de l'extrait. Le test d'activité antimicrobienne de l'extrait s'est montré actif sur tous les germes et les zones d'inhibition augmentent en fonction de l'augmentation de la concentration en extrait. L'activité antioxydante de l'extrait par le test de DPPH a révélé l'effet très actif de l'extrait comme piègeurs du radical DPPH. Ces résultats pourraient servir à développer des techniques de valorisation des écorces de fruit de *Punica granatum* comme agent de conservation naturel à la fois antioxydant et antimicrobien dans l'industrie agroalimentaire.

Références

- Garnier, G., Bezanger-Beauquesne, L., Debraux, G. Ed Vigot Frères. Tome II, (1961) 1511.
- FOURNIER, P. Editeur Paul Lechevalier. Tome II. 504 (1948) 286 - 291.
- Afaq, F., Malik, A., Syed, D. *Photochem Photobiol*; 81(2005)8-45.
- Jafri, MA., Aslam, M., Javed, K., Singh, S. *Journal of ethnopharmacology*. 70. (2000) 309-314.
- Braga, L.C., Leite, A.A., Xavier, K.G., Jakahashi, J.A., Bemguerrer, P.P., Chartone-Souza, E., and Nascimetho, A.M. *Candian Journal of Microbiology* 51 (2005) 541-547.
- Malik, A., Afaq, F., Sarfaraz, S., Adhami, VM., Syed, DN., Mukhtar, H. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102 (2005) 14813-1418.
- Navarro, P., Nicolas, TS., Gabaldon, JA., Mercader-Ros, MT., Calín-Sánchez, Á., Carbonell-Barrachina, ÁA y., Pérez-López, AJ. *Food Sci* 76(5) (2011) 319-32.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E y Pérez-Álva-rez JA. *Food Res Int* 44 (2011b) 1217-1223.
- Di Silvestro, RA., Di Silvestro, DJ y., Di Silvestro, DJ. *Phytother Res* 23 (2009) 1123-1127.

10. Ayala-Zavala ,JF., Wang, SY., Wang ,CY y., González-Aguilar ,GA. *Eur Food Res Tech* 221 (2005) 731-738.
11. Marouf . A., Analyse instrumentale à l'usage des biologistes (2002). 2eme édition Dar el Gharb . Oran 17 – 24.
12. Boizot, N et Charpentier, JP.*Le cahier des techniques de l'INRA*, n°spécial 2006, (2006) 79-82.
13. El Marnissi, B., Bennani,L., Cohen, N., El Ouali Lalami, A., Belkhou, R. : *African Journal of food science*, 7(5) (2013)87-91.
14. Sanchez , M. *International Journal of Foods Science and Technology*, 8 (2002) 121-137.
15. Laprent, JP and Laprent – Gourgau M. *Eléments de microbiologie*, (1985) :Paris:Hermann
16. Reddy , MK., Gupta, SK., Jacob ,MR., Khan ,SI y., Ferreira, D. *Planta Med* 73 (2007) 461–467.
17. Al-Zoreky, N.S. *International Journal of Food Microbiology*; 134 (2009) 244–248.
18. Choi, JG., Kang, OH., Lee, YS., Chae, HS., Oh, YC., Brice, OO., Kim, MS., Sohn, DH., Kim, HS., Park, H., Shin, DW., Rho ,JR y., Kwon, DY. *Evid Based Compl Alter Med* 17 (2009) 1–8
19. King, A et Young G. *Journal of the American dietetic association*, 99 (1999)213-218.
20. Kang, D-G., Yun, C-K., Lee H-S. *Journal of Ethno pharmacology*, 87 (2003) 231-23.
21. Seeram, N.P., Henning, S.M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z. & Heber, D. *Journal of Nutrition*, 136 (10) (2006)2481-2485.

(2014) ; <http://www.jmaterenvirosci.com>