

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Sciences des agroressources

Présentée et soutenue par :

Adolphe Christian NGAKEGNI-LIMBILI

le : jeudi 28 juin 2012

Titre :

Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserves
et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région
Afrique Centrale

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle - UMR1010 INRA/INP-ENSIACET - TOULOUSE

Directeur(s) de Thèse :

Pr Jean-Maurille OUAMBA - Université Marien NGouabi - Congo

Dr Zéphirin MOULOUNGUI - Université de Toulouse - France

Rapporteurs :

Thomas SILOU - Professeur - Université Marien NGouabi - Congo

Yaya MAHMOUT - MdC CAMES - HRD - Université de Doba - Tchad

Ahcène BOUMENDJEL - Professeur - Université Joseph Fourier - France

Membre(s) du jury :

Alain TCHAPLA (Président)

Jalloul BOUAJILA (membre)

Thomas SILOU (rapporteur)

Yaya MAHMOUT (rapporteur)

Ahcène BOUMENDJEL (rapporteur)



THESE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par :
INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE (INPT)

Discipline ou spécialité : Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

Adolphe Christian NGAKEGNI-LIMBILI

Le jeudi 28 juin 2012

Titre :

Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des huiles essentielles et des lipides de réserve des fruits et graines saisonniers de la région Afrique Centrale

Ecole Doctorale : Sciences de la Matière

Unités de Recherches

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle - UMR 1010 INRA/INP-ENSIACET – TOULOUSE
&

Unité Chimie du Végétal et de la Vie – Faculté des Sciences et Techniques – Université Marien Ngouabi - BRAZZAVILLE

Membres du jury :

Jean-Maurille OUAMBA (directeur de thèse)
Zéphirin MOULOUNGUI (directeur de thèse)
Alain TCHAPLA (président)
Thomas SILOU (rapporteur)
Yaya MAHMOUT (rapporteur)
Ahcène BOUMENDJEL (rapporteur)
Jalloul BOUAJILA (membre)
Anges ABENA (invité)
Pierre HUET (invité)



Résumé :

La composition en huiles essentielles et en lipides de réserve des graines et fruits saisonniers de quatre espèces végétales d'origine congolaise (*Aframomum stipulatum* (Gagnep) K. Schum, *Aframomum giganteum* (Oliv. & Hand) K. Schum, *Spondias mombin* L. et *Nephelium lappaceum* L.), a été déterminée par l'utilisation du couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse. Les résultats obtenus ont permis de comprendre la bioaccumulation des huiles essentielles et des lipides de réserve dans les organes des différentes espèces.

Dans le cas des espèces du genre *Aframomum*, les graines et les coques de fruits sont sources à la fois des huiles essentielles et des lipides de réserve. Les huiles essentielles des graines des deux espèces du genre *Aframomun* sont riches en composés monoterpéniques hydrocarbonés et oxygénés (β -pinène, 1,8-cinéole, phellandrène) avec des taux non négligeables de sesquiterpènes (α -sélinène et β -caryophyllène). Les huiles essentielles des coques des deux mêmes espèces se révèlent plus riches en monoterpénes oxygénés que celles des graines avec des composés très caractéristiques (β -pinène, 1,8-cineole, linalool pour *A. giganteum* et β -pinène, terpinéol, 1,8-cinéole pour *A. stipulatum*). On note dans les deux espèces, en dépit des procédés unitaires différents utilisés, la présence de lipides de réserve avec un profil acides gras du type palmitique-linoléique.

Seuls les lipides de réserve ont été caractérisés dans *Spondias mombin* L. et *Nephelium lappaceum* L.. Les différentes parties du fruit de *Spondias mombin* sont dominées, comme dans le cas des *Aframomum*, par la présence des acides palmitique-linoléique avec une présence marquée de l'hentriacontane dans l'huile de peaux de fruits. L'huile d'amande de *Nephelium lappaceum* se distingue par sa richesse en acide arachidique C20:0 et acide 11-eicosénoïque C20:1.

Les quatre espèces présentent un apport en phytostérols et en tocophérols.

Des essais prometteurs de formulation de phytoproduits ont été réalisés avec des mélanges de tensioactifs, des a-monoglycérides et des huiles essentielles de graines de *A. giganteum*.

Les activités antimicrobienne, anticancéreuse, antipaludique et anti-radicalaire ont été évaluées sur les extraits d'huiles essentielles et sur les lipides de réserve ainsi que sur les analogues synthétiques de lipides pris seuls ou en combinaison. Les résultats obtenus sont prometteurs.

Mots-clés : *Aframomum stipulatum*, *Aframomum giganteum*, *Spondias mombin*, *Nephelium lappaceum*, lipides de réserve, huiles essentielles, monoglycérides, activités biologiques.

Abstract:

The composition of essential oils and fat of seasonal fruits and seeds of four plant species from the Congo (*Aframomum stipulatum* (Gagnep) K. Schum, *Aframomum giganteum* (Oliv. & Hand) K. Schum, *Spondias mombin* L. and *Nephelium lappaceum* L.), was determined by the combined use of mass spectrometry and gas chromatography. The results were used for understanding the bio-accumulation of essential oils and the storage of lipids in the organs of different species.

In the case of the genus *Aframomum*, seeds and fruit shells are both sources of essential oils and fat. Seeds essential oils of the two species of *Aframomun* were rich in hydrocarbon and oxygenated monoterpene compounds such as β -pinene, 1,8-cineole, phellandrene, with significant levels of sesquiterpenes (α -selinene and β -caryophyllene). The shells essential oils of the same two species appear to be more rich in oxygenated monoterpenes than seeds, with a large structural features (β -pinene, 1,8-cineole, linalool for *A. giganteum* and β -pinene, terpineol, 1,8 -cineole for *A. stipulatum*). It is notified in both species that despite the different unit processes used, the presence of lipid with a fatty acid profile of the type palmitic-linoleic. Only lipids have been characterized from *Spondias mombin* L. and *Nephelium lappaceum* L.. The different parts of the fruit of *Spondias mombin* are dominated, like *Aframomum*, by the presence of palmitic-linoleic with a large presence of hentriacontane in the oil fruit skins. The kernel oil *Nephelium lappaceum* is distinguished by its wealth of arachidic acid C20:0 and 11-eicosénoïc acid C20:1.

The four species contained in phytosterols and tocopherols.

Testing promising formulation of herbal products were made with mixtures of surfactants, α -monoglycerides and essential oils from seeds of *A. giganteum*.

Antimicrobial, anticancer, antimalarial and anti-radical activities were evaluated on the essential oils on the lipid as well as on the synthetic analogs of lipid alone or in combination. The results are promising.

Key words: *Aframomum stipulatum*, *Aframomum giganteum*, *Spondias mombin*, *Nephelium lappaceum*, lipids reserve, essential oil, monoglycerides, biological activities.

A MES PARENTS

Toute ma reconnaissance et mon affection.

Remerciements

Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été menées en cotutelle entre l'Université Marien Ngouabi de Brazzaville (Congo) et l'Institut National Polytechnique (INP) de Toulouse (France). Ces travaux ont été codirigés par :

- Monsieur Jean-Maurille OUAMBA, Professeur Titulaire CAMES, Responsable de l'Unité de Chimie du Végétal et de la Vie (UC2V), siège du Pôle d'Excellence Régional de l'Agence Universitaire de la Francophonie « Formation et Recherche sur la Pharmacopée et la Médecine Traditionnelles Africaines » (PER-AUF-PMTA), Faculté des Sciences et Techniques de Brazzaville,
- et Monsieur Zéphirin MOULOUNGUI, Directeur de Recherche INRA, Responsable du groupe de recherche Lipo-Oléo-Protéo-Chimie du Laboratoire de Chimie Agroindustrielle (LCA) de Toulouse.

Nous tenons à leur exprimer tous nos remerciements pour nous avoir accepté de mener ce projet, nous avoir encouragé et surtout pour la confiance qu'ils nous ont accordée tout au long de ces années de formation.

Nous voudrions leur exprimer toute notre reconnaissance pour la rigueur et la façon de travailler et surtout pour la patience dans la correction de ce mémoire. Ils nous ont permis de conjuguer la connaissance végétale avec la chimie analytique et les applications industrielles.

Ces travaux ont bénéficié des appuis multiformes sans lesquels le projet ne saurait être mené à terme. Nous exprimons toute notre profonde gratitude :

- à la Société (ESPA) et plus particulièrement à son directeur général, Monsieur Pierre HUET, pour l'allocation complémentaire de financement qu'elle nous a apportée durant l'exécution du projet (INPT contrat 2008-0071).
- au Service de Coopération et d'Action Culturelle près l'Ambassade de France au Congo qui a mis à notre disposition une bourse de formation à la recherche et en alternance trois années successives. Nous tenons ici à remercier particulièrement Monsieur Yannick MEVEL et Madame Marine DE HEAULME.
- à l'Agence Universitaire Francophone (AUF), pour la bourse de recherche dont j'ai bénéficié pendant une année.
- Aux autorités académiques de l'Institut National Polytechniques de Toulouse et de l'Université Marien Ngouabi de Brazzaville pour toutes facilités administratives durant toute la durée de la thèse.

Nous remercions tous les membres du jury qui, malgré leurs occupations, ont accepté de juger ce travail :

- Monsieur Alain TCHAPLA, Professeur Emérite, Université Paris XI-Orsay. Président du jury, pour l'honneur qu'il nous fait de présider ce jury. Nous le remercions particulièrement de nous avoir fait bénéficier de sa grande expérience en analyses chimiques et de ses multiples conseils.
- Monsieur Thomas SILOU, Professeur Titulaire CAMES, Université Marien Ngouabi (Congo), qui a accepté de participer à ce jury en qualité de rapporteur interne pour le compte de l'Université Marien Ngouabi ;
- Monsieur Ahcène BOUMENDJEL, Professeur, Université Joseph Fourier (France), qui a accepté de participer à ce jury en qualité de rapporteur externe pour le compte de l'Institut polytechnique de Toulouse. Nous lui exprimons notre gratitude pour les suggestions d'amendements qui ont enrichi ce mémoire.
- Monsieur Yaya MAHMOUT, Maître de Conférences CAMES, Université de N'Djaména (Tchad), qui a accepté de participer à ce jury en qualité de rapporteur externe. Nous le remercions de nous avoir fait bénéficier d'une grande expérience en participant des années durant à notre formation à la recherche, notamment dans le domaine passionnant de la chimie du végétal. Nous lui exprimons notre profonde gratitude pour les enseignements tirés de nombreux échanges fructueux, qui ont énormément enrichi ce travail.
- Monsieur Jalloul BOUAJILA, Maître de Conférences HDR à l'Université de Toulouse (France), qui a accepté de participer à ce jury en qualité d'examinateur pour le compte de l'Université de Toulouse. Nous le remercions particulièrement pour nous avoir fait bénéficier de sa noble expérience dans la réalisation des tests biologiques.

Enfin, nous remercions tout particulièrement :

- les docteurs Bachar ZEBIB et Romain VALENTIN, chargés de recherche INRA, pour leurs amitiés, leurs appuis, leurs conseils et pour leurs contributions à la réalisation de ce travail.
- Les docteurs Célestine NKOUNKOU-LOUMPANGOU et Tsiba GOUOLALLY, pour les aides multiples et les précieux conseils pendant toute la durée de ce travail.
- les docteurs Jean-Marie MOUTSAMBOYE et TSIKA MIKOKO, Maîtres assistants enseignants chercheurs à l'Université Marien Ngouabi, Brazzaville (Congo), pour la contribution à l'identification botanique des espèces végétales.

- Mureil CERNY, Technicienne au laboratoire de Chimie Agro-industrielle, pour les conseils éclairés sur les traitements des données.
- Les populations d’Owando et de Boko, et particulièrement Messieurs OKOUERE, Guy ELENGA et MBEMBA Lévy Python, pour leur aide en tant que guides lors des campagnes de récolte à Owando et à Boko.

Un grand merci enfin :

- à mes amis et collègues des différents laboratoires à Toulouse et à Brazzaville pour tous les bons moments et les rires ;
- à tous ceux qui m’ont encouragé et soutenu.
- au personnel du Laboratoire de Chimie Agroindustrielle de l’École Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques de Toulouse, que j’ai côtoyé pendant mes séjours de recherche au LCA.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE I : Exploitation de la biodiversité.....	18
I- LES HUILES ESSENTIELLES ET LES LIPIDES DE RESERVE	18
I-1. Les huiles essentielles.....	18
I-1.1. Définition et localisation	18
I-1.2. Caractéristiques conventionnelles	19
I-1.3. Activités biologiques des huiles essentielles.....	20
I-1.4. Le marché mondial des huiles essentielles	21
I-2. Constituants lipidiques	22
I-2.1. Constituants majeurs	23
I-2.2. Activités biologiques des lipides	24
I-2.3. Le marché mondial des huiles végétales	25
I-3. Biosynthèse des composés terpéniques et des composés glycérolipidiques.....	26
II- LES PLANTES A HUILES ESSENTIELLES ET/OU A LIPIDES DE RESERVE	30
III- ZONE D'ETUDE ET CONNAISSANCE DES QUATRE ESPECES A FRUITS SAISONNIERS DU CONGO-BRAZZAVILLE	32
III-1. Présentation de la zone d'étude	32
III-2. Connaissance des quatre plantes à fruits saisonniers du Congo	33
III-2.1. Description botanique, usages traditionnels et travaux antérieurs sur les espèces du genre Aframomum	33
III-2.1.1. Rappel sur la famille des Zingiberaceae.....	33
III-2.1.2. Espèce Aframomum gigantem (Oliv&Hanb) K. Schum.....	34
a) Noms et position systématique	34
b) Description botanique.....	34
c) Usages traditionnels.....	35
d) Etudes et travaux antérieurs.....	36
III-2.1.3. Espèce Aframomum stipulatum (Gagnep) K. Schum	37
a) Noms et position systématique	37
b) Description botanique.....	37
c) Usages traditionnels.....	38
d) Etudes et travaux antérieurs.....	38

III-2.2. Description botanique, usages traditionnels et travaux antérieurs sur l'espèce <i>Spondias mombin</i> Linn. (Anacardiaceae).....	39
III-2.2.1. Rappel sur la famille des Anacardiaceae	39
III-2.2.2. Espèce <i>Spondias mombin</i> Linn.	40
a) Noms et position systématique	40
b) Description botanique.....	40
c) Usages traditionnels.....	41
d) Etudes et travaux antérieurs.....	42
III-2.3. Description botanique, usages traditionnels et travaux antérieurs sur l'espèce <i>Nephelium lappaceum</i> Linn. (Sapindaceae)	44
III-2.3.1. Rappel sur la famille des Sapindaceae	44
III-2.3.2. Espèce <i>Nephelium lappaceum</i> Linn.	44
a) Noms et position systématique	44
b) Description botanique.....	45
c) Usages traditionnels.....	46
d) Travaux antérieurs	46
IV- CONCLUSION	47
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	49
CHAPITRE II : Etude phytochimique des fruits et graines saisonniers des quatre plantes à huiles essentielles et à lipides de réserve	57
I- INTRODUCTION	57
II- MATERIEL ET METHODES	57
II-1. Récolte	57
II-2. Séchage des plantes	58
II-3. Détermination des grandes familles chimiques constitutives des végétaux	58
II-4. Procédé d'extraction et caractérisation de la fraction huile essentielle	59
II-4.1. Extraction des huiles essentielles	59
II-4.2. Analyses physico-chimiques par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	60
II-4.3. Analyses chimiques par Chromatographie en Phase Gazeuse munie d'un DéTECTEUR à Ionisation de Flamme (CPG/DIF)	61
II-4.4. Analyses chimiques par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM)	61
II-5. Procédé d'extraction et caractérisation de la fraction lipidique.....	62
II-5.1. Extraction des lipides	62
II-5.1.1. Méthode d'extraction à froid de l'huile.....	62

II-5.1.2.	Méthode de référence (Soxhlet)	63
II-5.1.3.	Méthode par extraction automatique (ASE).....	63
II-5.2.	Caractérisation de la fraction lipidique :.....	64
II-5.2.1.	Saponification et obtention des acides gras (A.G.)	64
II-5.2.2.	Analyse des acides gras par Chromatographie en Phase Gazeuse munie d'un DéTECTeur à Ionisation de Flamme (CPG/DIF)	64
II-5.3.	Dosage des stérols.	65
II-5.3.1.	Analyse des phytostérols par Chromatographie en Phase Gazeuse munie d'un DéTECTeur à Ionisation de Flamme (CPG/DIF)	66
II-5.4.	Dosage des tocophérols	67
II-5.4.1.	Analyse quantitative des tocophérols par Calibration externe	67
II-6.	Répétabilité des analyses	68
III-	RESULTATS ET DISCUSSIONS	69
III-1.	Analyse phytochimique des graines et coques des fruits de Aframomum giganteum (K. Schum) et de Aframomum stipulatum (K. Schum).....	69
III-2.	Observation au microscope des graines de fruits de Aframomum stipulatum (Gagnep) K. Schum et de Aframomum giganteum (Oliv.&Hand) K. Schum	70
III-3.	Etudes qualitative et quantitative des huiles essentielles de Aframomum stipulatum K. Schum et de Aframomum giganteum K. Schum.....	71
III-4.	Etudes de la fraction lipidique des graines et coques de fruits de Aframomum stipulatum (gagnep) K. Schum et de Aframomum giganteum (Oliv&Hanb) K. Schum	74
III-4.1.	Rendements d'extraction des huiles de réserve de Aframomum giganteum et Aframomum stipulatum.....	74
III-4.2.	Composition en acides gras	75
III-4.3.	Composition en phytostérol.....	78
III-4.4.	Composition en tocophérols	79
III-5.	Etude phytochimique du fruit de Spondias mombin L.....	80
III-5.1.	Evaluation de la teneur en lipides totaux des différentes parties du fruit de Spondias mombin L.....	80
III-5.2.	Analyse de la fraction lipidique des différentes parties du fruit de Spondias mombin L.....	81
III-5.2.1.	Composition en acides gras	81
III-5.2.2.	Détermination de la composition en phytostérols	82
III-5.2.3.	Composition en tocophérols	83
III-5. 3.	Conclusion.....	84
III-6.	Etude phytochimique de l'amande de Nephelium lappaceum L	85
III-6.1.	Evaluation de la teneur en lipides totaux de l'amande de Nephelium lappaceum.....	85

III-6.2. Analyse de la fraction lipidique des amandes de fruits de <i>Nephelium Lappaceum</i> L.	85
III-6.2.1. Composition en acides gras	86
III-6.2.2. Composition en phytostérols	87
III-6.2.3. Composition en tocophérols	88
III-6.2.4. Conclusion.....	88
IV- CONCLUSION	89
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	91
CHAPITRE III : Lipotransformation des lipides de réserve de Néphelium lappaceum L. : etude des propriétés physiques des binaires en acides gras, en monoglycérides et diglycérides saturés C20:0 et monoinsaturés C18:1, C20:1	94
I- INTRODUCTION	94
II- HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES TRIGLYCERIDES NATIFS	95
II-1. Etude bibliographique de la réaction d'hydrolyse enzymatique des triglycérides	95
II-2. Partie expérimentale	97
II-3. Résultats	98
III- LES MONOGLYCERIDES, VALEUR AJOUTEE DES ACIDES GRAS EN LIPOCHIMIE..	102
III-1. Etude bibliographique	102
III-2. Réaction d'estérification du glycérol par les acides gras de <i>N. Lappaceum</i>	104
III-2.1. Généralités.....	104
III-2.2. Protocole opératoire.....	105
III-2.3. Cinétique d'estérification	106
III- ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES DES MONOGLYCERIDES DE <i>N. LAPPACEUM</i>	108
IV-1. Monoglycérides et paramètres de formulation	109
IV- Coefficient de partage.....	111
V- CARACTÉRISATIONS ET PROPRIÉTÉS PHYSIQUES	112
V-1. Matériels et méthodes	113
V-1.1. Microscopie optique	113
V-1.2. Analyse enthalpique différentielle.....	114
V-1.3. Détermination des points de fusion	115
V-1.4. Méthode de séparation et purification par chromatographie flash	115
V-2. Résultats et discussion	116
V-3. Etude du polymorphisme.....	119
VI- CONCLUSION	125
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	127

CHAPITRES IV : Etudes des effets synergiques.....	131
PARTIE 1 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES MATRICES BIOLOGIQUES NATIVES ET DE LEURS MELANGES HOMOGENES ET HETEROGENES (EFFET DU SYNERGISME OU D'ANTAGONISME SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE TOTALE).....	
I- INTRODUCTION	132
II- SYNERGISME, ADDITIVITE ET ANTAGONISME BIOLOGIQUE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	133
III- PARTIE EXPERIMENTALE	136
III-1. Evaluation de l'activité antioxydante : test avec le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)	136
III-1.1. Test des extraits non volatils (lipides)	136
III-1.2. Test des extraits d'huiles essentielles	137
III-2. Matrices natives et méthodes de libération.....	137
III-3. Formulation des matrices biologiques natives.....	137
IV- RESULTATS ET DISCUSSION	138
IV- 1.1. Matrices natives individuelles	138
III-1.2. Mélanges croisés	140
III-1.3. Mélanges hétérogènes	141
a) Modèle des émulsions	146
b) Modèle de complexation	147
V- CONCLUSION	148
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	149
PARTIE 2 : EVALUATION DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNE, ANTIFONGIQUE, ANTIPLASMODIALE, ET ANTICANCEREUSE DES MATRICES BIOLOGIQUES NATIVES ET DE LEURS COMBINAISONS BINAIRES (EFFET DU SYNERGISME OU D'ANTAGONISME SUR CERTAINES ACTIVITES BIOLOGIQUES)	
I- INTRODUCTION	153
II- PARTIE EXPERIMENTALE	154
II-1. Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique.....	154
II-1.1. Origine et identification des bactéries	154
II-1.2. Préparation des milieux de culture	155
II-1.3. Préparation de la suspension bactérienne	155
II-1.4. Préparation des solutions à tester.....	156
II-1.5. Antibiogramme	156
II-2. Evaluation de l'activité antiplasmodiale et cytotoxicité	156

II-2.1. Evaluation de l'activité antimalarique in vitro	156
II-2.2. Test de cytotoxicité.....	157
III- RESULTATS ET DISCUSSIONS	158
III-1. Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles	158
III-2. Activité antiplasmodiale des huiles essentielles et extraits lipidiques.....	160
III-3. Evaluation de l'activité antiplasmodiale des extraits lipidiques.....	161
III-4. Evaluation de l'activité antiplasmodiale des mélanges hétérogènes	161
III-5. Activité anticancéreuse des huiles essentielles.....	162
IV- CONCLUSION	163
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	167
ANNEXES	170

INTRODUCTION GENERALE

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, médicaments, abris et également pour ses besoins en matière première pour des produits de première nécessité. Bien qu'une grande partie du XX^{ème} siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening des ressources naturelles a conduit à la découverte d'un grand nombre de plantes à huile essentielle et de plantes à lipides de réserve utiles. Ces plantes commencent à jouer un rôle majeur dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

L'utilisation des plantes et de leurs vertus pour répondre à certains besoins de l'homme est connue depuis l'antiquité et évolue avec l'histoire de l'humanité. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives pour lesquelles il convient de préciser les propriétés et valider les usages. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de cette biodiversité végétale.

La région Afrique centrale dispose d'une flore naturelle très riche et diversifiée, quasiment inexplorée et inexploitée, qui est au centre de la vie des populations. La plupart des espèces, pérennes ou saisonnières, possèdent des extraits actifs et utiles pour les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

Le but de cette étude est de renforcer la connaissance phytochimique de certaines plantes saisonnières d'Afrique centrale, répandues dans le bassin du Congo et de mettre en évidence des traceurs spécifiques pour chacune des plantes. La mise au point continue de méthodes de criblage biochimique et biologique contribue à l'isolement de composés actifs à partir d'extraits végétaux. La performance croissante des techniques analytiques et préparatives, ainsi que l'accès à la littérature de plus en plus facilité, rendent leur caractérisation aisée. De plus, les plantes sources de médicaments présentent l'immense avantage d'être accessibles à tous, et particulièrement aux pays en voie de développement.

L'approfondissement des connaissances sur les plantes de ces pays est capital, afin d'optimiser l'utilisation ultérieure de leurs extraits dans l'industrie.

Cette exploitation du potentiel chimique des Agroressources passe par une première étape d'extraction des composés spécifiques d'espèces botaniques sélectionnées. Malheureusement ces molécules souvent à forte valeur ajoutée, sont présentes dans ces espèces en faible quantité. De nouveaux procédés d'extraction doivent donc être développés de façon à obtenir ces constituants dans des concentrations maximales, et dans un état chimique le plus proche possible de leur structure native. Quelques unes de ces molécules présentent une activité biologique, ainsi qu'une activité olfactive et énergétique, intéressantes.

Certaines plantes co-génèrent des espèces chimiques composant les huiles essentielles et les lipides de réserve. Il s'avère que le fort potentiel des huiles essentielles en composés terpéniques (mono-, sesqui-, di-terpènes) oxygénés ou pas d'une part et l'apport de certains constituants lipidiques comme les acides gras essentiels, les phytostérols et les tocophérols d'autre part, semble indiquer que les organes des plantes sont des sites par excellence de bioaccumulation des métabolites secondaires fonctionnels.

Ce mémoire se fixe comme objectif d'étudier les effets synergiques chimiques et biologiques des huiles essentielles et des lipides de réserve des fruits et graines de ces espèces. Il nous a paru intéressant d'épuiser le potentiel organique lipophile de ces graines en étudiant l'extraction des lipides de réserve par deux procédés : l'extraction au Soxhlet et l'ASE (Accelerated Solvent Extraction), étant donné qu'elles sont connus pour être des sites d'accumulation des lipides. Nous avons procédé à l'extraction de ces agro-constituants des huiles essentielles par la technique d'hydrodistillation. L'identification et la caractérisation de ces constituants ont été réalisées par des méthodes analytiques croisées (CPG/DIF, CPG/SM).

L'étude développée se propose de mettre en œuvre les huiles essentielles, les fractions lipidiques, aides gras, monoglycérides intervenant ensemble pour jouer un rôle en synergie ou non, par des approches de structure - activité.

Plus particulièrement il est apparu intéressant d'étudier les propriétés biologiques (anti-oxydante, antiplasmodiale et anticancéreuse) des huiles essentielles et des lipides de réserve présentant une ou plusieurs activités biologiques.

Les travaux de thèse décrits dans ce manuscrit ont été alternativement réalisés à Brazzaville et à Toulouse dans les trois structures suivantes :

- la sélection, la description, la récolte et la préparation des échantillons d'huiles essentielles et de quelques extraits des espèces végétales, matières premières nécessaires au projet, ainsi que les tests antimicrobiens, au sein de l'Unité de Chimie du Végétal et de la Vie de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Marien Ngouabi, Brazzaville – Congo ;
- les extractions à l'ASE des lipides de réserve, la caractérisation des extraits, la synthèse des monoglycérides, les formulations et les tests d'activité antioxydante au Laboratoire de Chimie-Agro-Industrielle, Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques de l'Institut National Polytechnique de Toulouse – France ;
- Les tests antiplasmodial et cytotoxique, à la Faculté de pharmacie de Toulouse - France.

Ce mémoire comprend quatre chapitres.

Le premier chapitre porte sur une mise au point bibliographique sur les huiles essentielles et les lipides de réserve, sur les plantes à huiles essentielles et/ou à lipides de réserve, et sur les quatre espèces retenues pour l'étude.

Le deuxième chapitre aborde les méthodes et les conditions opératoires des procédés d'extraction et les techniques d'analyse des huiles essentielles et de certains groupes de composés des lipides de réserve ; leurs localisation dans des fruits et graines de *Aframomum giganteum* K. Schum et de *Aframomum giganteum* K. Schum, de *Spondias mombin* L. et de *Nephelium lappaceum* L. sélectionnées pour leur caractère saisonnier.

Le troisième chapitre est consacré à la lipotransformation des lipides de réserve de *Nephelium lappaceum* L. où nous nous intéresserons respectivement à la production et à l'analyse des α-monoglycérides par l'estérification des acides gras issus de l'huile de *Nephelium lappaceum* riche en acide gras C20:0.

Enfin un **quatrième chapitre** où, nous évoquerons l'étude des propriétés biologiques des extraits obtenus par les méthodes employées, constitués des huiles essentielles et des lipides de réserve. Nous aborderons l'utilisation de certains acides gras, puis du mélange des monoglycérides produits avec des huiles essentielles et des oligo-éléments dans une phase de formulation. Les essais effectués par ces outils de fractionnement et de transformation seront également présentés ainsi que les résultats préliminaires des tests biologiques réalisés dans cette étude pour une approche des effets en synergie.

CHAPITRE I : Exploitation de la biodiversité

I- LES HUILES ESSENTIELLES ET LES LIPIDES DE RESERVE

I-1. Les huiles essentielles

I-1.1. Définition et localisation

La norme AFNOR NF T 75-006 [1] définit l'huile essentielle comme « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation ». L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques, par exemple la décantation, par l'utilisation d'un solvant plus volatil que l'eau (éther diéthylique, pentane, etc.).

Environ cinquante familles végétales, soit 10 % des végétaux supérieurs, contiennent des principes aromatiques ou essences [2]. Dans la plante, les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, de santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane) ou graines (carvi). Les huiles essentielles sont classées parmi les métabolites secondaires ; leur biosynthèse et leur accumulation se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante [2]. Elles se situent soit dans les poils sécréteurs, soit au niveau des canaux sécréteurs ou encore des poches sécrétrices (figure I.1) [3]. Les poils sécréteurs ou poils glandulaires épidermiques sont rencontrés dans les organes de plantes de quelques familles : Verbenaceae, Lamiaceae, Geraniaceae et autres. Les canaux sécréteurs ou canaux glandulaires sont présents dans la plupart des bois résineux de la famille des Abiétiacées et des Cupressacées ; ces glandes sont aussi retrouvées dans des organes des espèces de la famille des Burseraceae, des Anacardiaceae, Apiaceae et Dipterocarpaceae. Les poches sphériques schizogènes sont des glandes qu'on retrouve chez les espèces de la famille des Rubiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Hypericaceae et Rosaceae.

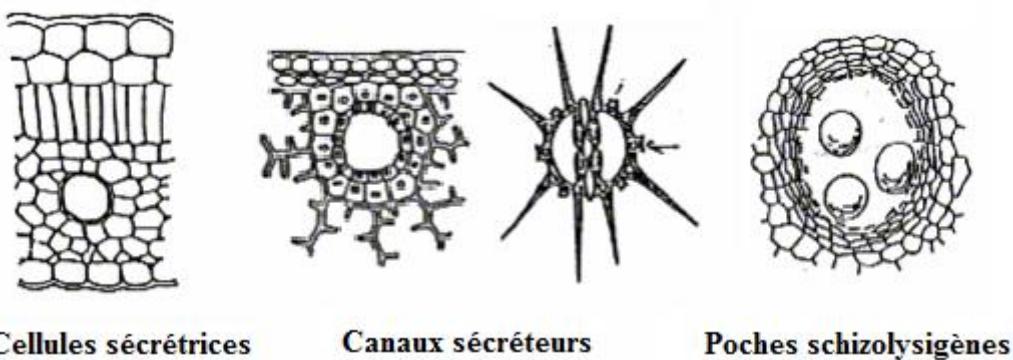


Figure I. 1: *Quelques organes sécréteurs d'huiles essentielles*

Une gamme de produits à odeur plus ou moins prononcée selon la concentration en composés volatils recueillis, est alors obtenue. Les huiles essentielles produites par hydrodistillation, entraînement à la vapeur ou expression de l'écorce des fruits, sont les produits les plus concentrés en composés olfactifs [4].

Il existe d'autres méthodes pour l'obtention indirecte d'extraits aromatiques comme les huiles essentielles en fonction du matériel à traiter [4] :

- Extraction par solvant : c'est un procédé qui conduit à l'obtention des concrètes, des résinoïdes et des absolues ; le matériel végétal frais est par la suite épuisé par des solvants organiques volatils ;
- Enfleurage ou digestion : procédés développés à froid ou à chaud et utilisant les organes végétaux fragiles comme les fleurs aromatiques qui permettent d'obtenir des huiles ou des graisses.

On connaît également de nouvelles techniques comme l'extraction par les fluides supercritiques et l'extraction par micro-ondes.

I-1.2. Caractéristiques conventionnelles

Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées de nos jours sous forme de décoctions et infusions ; mais, la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse [5]. Cependant, les connaissances actuelles permettent d'analyser ces plantes et souvent de comprendre l'activité préconisée par les ancêtres.

Une relation entre la structure chimique et l'activité biologique est alors tentante, aussi la production de molécules naturelles pourrait entrer dans la composition de médicaments moins agressifs vis-à-vis de l'organisme, ou à des fins industrielles précédemment exposées.

Cette dernière perspective permet d'élargir le champ de valorisation des plantes aromatiques, (autrefois restreint du point de vue économique, à l'extraction de molécules olfactives), par l'exploitation de nombreuses et diverses activités biologiques, substantiellement évoquées par la médecine traditionnelle, que nous allons recenser et corrélérer à de structures chimiques types.

I-1.3. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origines bactérienne et fongique [6]. Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques [7] qui les rapprochent des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Dans les préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques[8, 9].

Dans les domaines phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs sont également employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires [10, 11].

Les huiles essentielles, plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antimicrobiennes, antibactériennes et antifongiques, possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, antivirales [12], stimulantes, toniques et même irritantes [10]. Ces propriétés sont étroitement liées à la nature de leurs constituants et des groupements ou fonctions chimiques qu'ils possèdent ; c'est le cas de l'activité antifongique qui décroît selon le type de fonctions chimiques :



Les propriétés biologiques des huiles essentielles sont associées à la prédominance des fonctions chimiques. Etant donné la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, et malgré de possibles synergies, certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile [13-15].

I-1.4. Le marché mondial des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont valorisées principalement sur les marchés de l'aromathérapie, de la parfumerie et de la cosmétique. Elles peuvent, soit rentrer dans la composition de produits élaborés (savons, crèmes, parfums, bougies,...), soit être utilisées en l'état. Elles sont recherchées pour leurs propriétés odorantes ou thérapeutiques. Les principaux marchés de consommation sont les pays développés qui représentent 80% des débouchés mondiaux (Europe 30 %, Japon et Amérique du Nord 50 %) (tableau I.1) [16].

Tableau I. 1: Marché mondial des huiles essentielles

Marchés	Marché mondial (en milliards d'Euro)	Part des importations (en pour-cent)	Part des exportations (en pour-cent)
Europe de l'Ouest	35	49	65
Etats-Unis et Canada	35	-	15
Japon	14	-	5
Europe de l'est	5	8	2
Méditerranée	2	3	1

Les pays d'Amérique du Sud et d'Asie font partie des plus grands producteurs mondiaux d'huiles essentielles. Plus de 50% des exportations des huiles essentielles du marché européen sont dominées par quelques pays : l'Allemagne constitue le plus grand marché (20 %), suivi par la France (18 %), le Royaume-Uni (16 %), l'Italie (14 %) et l'Espagne (10 %) qui disposent d'industries de parfumerie, de cosmétique et de détergence. Ce secteur connaît une croissance modérée de l'ordre de 3,5 % par an pour le marché européen.

Le marché des pays émergents constitue un marché prometteur particulièrement pour les produits de gamme basse et moyenne.

En Afrique, les quantités produites sont très faibles et les besoins sont compensés par des volumes importés à travers le monde, excepté l'Afrique du Nord où les pays du Maghreb (Maroc et Tunisie principalement) sont les leaders dans cette région. Les Comores et Madagascar font partie aussi des grands producteurs mondiaux qui exportent leur production (tableau I.2).

Tableau I. 2: Estimation sur le marché des exportations africaines et mondiales en francs cfa.

Exportateurs	valeur exportée en 2007 (en francs CFA)	valeur exportée en 2008 (en francs CFA)	valeur exportée en 2009 (en francs CFA)
Maroc	12 715 515 000	15 577 210 000	11 330 845 000
Egypte	-	8 957 125 000	9 401 870 000
Madagascar	6 551 965 000	6 400 660 000	8 140 340 000
Afrique du Sud	6 922 040 000	10 178 700 000	6 610 260 000
Tunisie	5 240 000 000	5 393 270 000	3 825 855 000
Comores	3 794 415 000	3 957 510 000	2 642 925 000
Côte d'Ivoire	765 695 000	605 220 000	369 420 000
Kenya	210 255 000	189 950 000	304 575 000
Part Afrique à l'exportation (5%)	36 711 440 000	52 304 370 000	43 153 365 000
Exportation mondiale	1 163 989 365 000	1 277 160 265 000	1 131 906 155 000

(Source : Comtrade 2011)

I-2. Constituants lipidiques

Les lipides sont un ensemble hétérogène de composés dont les structures chimiques et les propriétés physico-chimiques sont très différentes, contrairement aux autres familles de composés biogènes comme les protéines ou les sucres, relativement homogènes d'un point de vue chimique. Ils sont utilisés par les organismes comme source ou réserve de carbone et d'énergie ou comme composant essentiel des membranes cellulaires [17]. Ils peuvent également jouer un rôle d'isolation thermique (graisses) chez les animaux supérieurs ou d'isolation mécanique dans les cellules.

Les différentes classes de lipides ont des origines et des fonctions différentes au sein des organismes vivants. On peut distinguer les lipides de réserve, les lipides structuraux, et les lipides du métabolisme, issus de la synthèse et du catabolisme des autres classes de lipides.

Les lipides de réserve sont des esters d'acide gras qui constituent la réserve lipidique majeure des organismes [18]. Ils sont représentés par les triglycérides (TG), les esters de stérols (ES) et les cires.

D'une manière plus générale, on classe les lipides en deux grandes catégories (figure I.2) : les lipides à base d'acides gras et les lipides à base d'isoprène (lipides polyisopréniques).

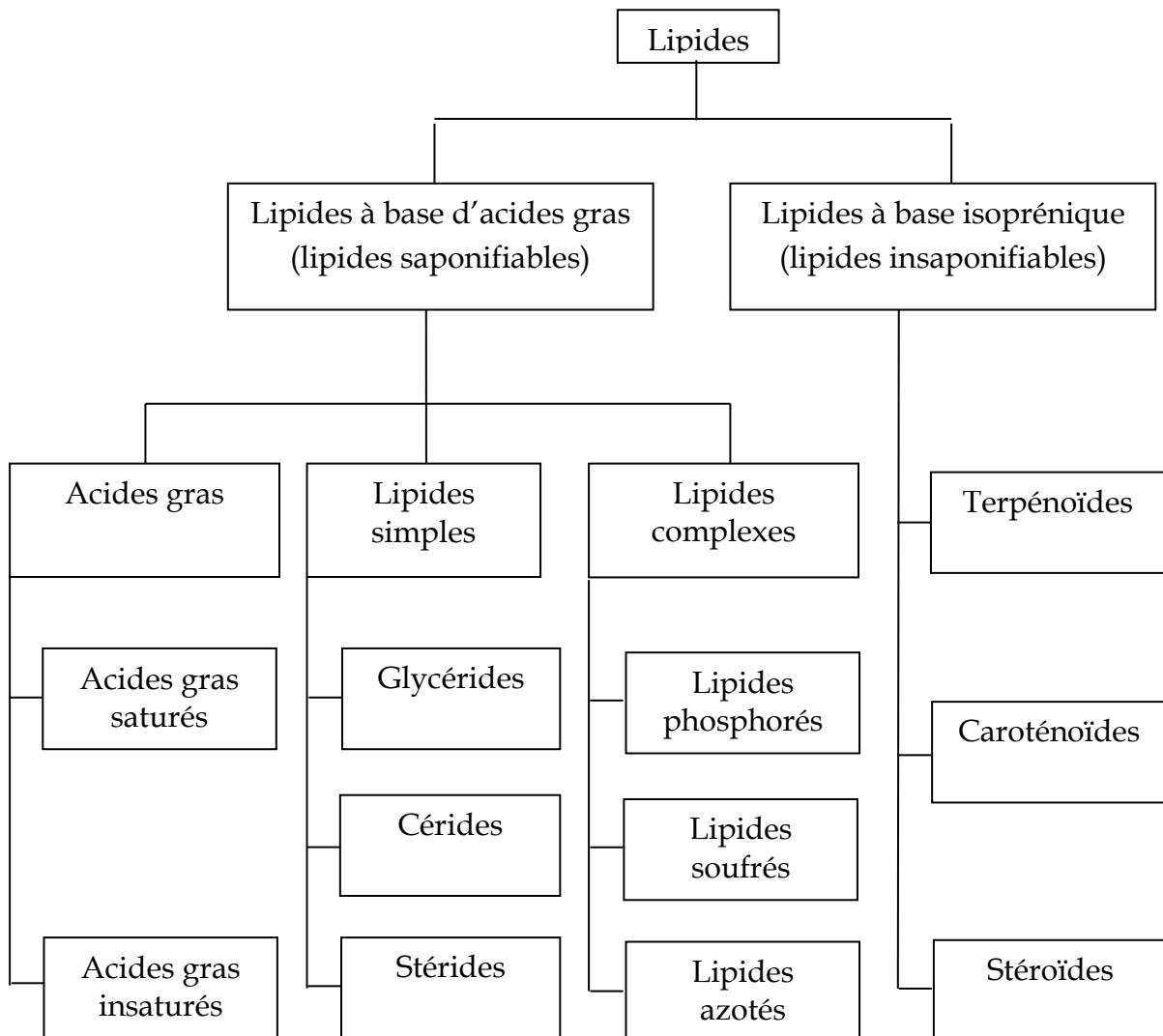


Figure I. 2 : Classification des lipides

I-2.1. Constituants majeurs

Les lipides de réserve sont majoritairement constitués de triglycérides ou triacylglycérols (TAG) (95 à 99% des huiles). Le reste de la fraction lipidique (1 à 5%) renferme des composés dits « mineurs » en raison de leur faible teneur, tels que des phospholipides, des alcools aliphatiques et triterpéniques, des cires, des pigments, des tocophérols et des stérols.

Les triglycérols d'acides gras (TAG) sont constitués d'un glycérol estérifié par trois acides.

Les TAG sont présents généralement dans tous les tissus en tant que constituants des membranes et s'accumulent dans les tissus de stockage des graines oléagineuses. Ils sont considérés comme chimiquement inertes et non toxiques. Ce sont des composés à fort potentiel énergétique pour la cellule et à ce titre, ils contribuent fortement aux réserves germinatives de la plantule.

Les lipides de réserve peuvent avoir des utilisations non-alimentaires. On utilise les productions végétales ou des agro-ressources appelées oléagineuses, qui trouvent leurs débouchés dans des secteurs aussi divers et hétérogènes que complexes (des biocarburants, les biolubrifiants, les tensioactifs, les séquestrants et agents de blanchiment, les solvants, les biopolymères, etc) avec un positionnement grâce à leurs caractéristiques intrinsèques (renouvelables, biodégradables, etc.).

Les triglycérides sont les constituants majeurs des lipides de réserve, leur intérêt est tout autant lié à la nature des acides gras qu'ils renferment. Ils sont faiblement solubles dans l'eau et cette caractéristique dépend de la nature de chaîne carbonée et des conditions environnementales (pH, température). À température ordinaire, les acides gras insaturés sont liquides (huiles) et les acides gras saturés sont solides (graisses), à l'exception des acides à chaînes carbonées courtes.

Cependant, on trouve d'autres constituants comme les phospholipides, les mono et les diglycérides qui sont des émulsifiants. La fraction insaponifiable représente l'ensemble des composants représentant environ 0,2 à 2% de l'huile. Elle est très variable d'un corps gras à l'autre, elle est intrinsèque à l'organe et à la plante et dépend également des traitements subits. Elle se compose de stérols (phytostérols pour les matières grasses végétales) et de tocophérols avec 4 isomères (α , β , γ , δ) et parfois les pigments caroténoïdes ; des proportions de cette fraction insaponifiable pouvant aller exceptionnellement jusqu'à 10% sont observées dans le beurre de karité [19].

I-2.2. Activités biologiques des lipides

La composition et le contenu des constituants majeurs et mineurs définissent l'activité physiologique des huiles végétales. C'est le cas de certains acides gras qui peuvent même en faible quantité présenter de fortes activités et définir les propriétés intéressantes pour l'huile. De nombreux travaux de recherche et certaines données de la littérature [20, 21] rapportent un intérêt grandissant sur le marché indiquant une utilisation de certaines espèces concernées par la richesse de leurs constituants dans divers secteurs applications actuelles avec perspectives à venir. Celles-ci peuvent être regroupées dans plusieurs domaines : agronomiques, alimentaires, production de molécules à intérêt industriel (les intermédiaires et adjuvants

chimiques) et production de molécules destinées à la santé humaine (les produits pharmaceutiques et de cosmétique).

Enfin, les corps gras alimentaires jouent un dernier rôle physiologique, celui de l'apport et véhicule des vitamines liposolubles comme la vitamine E, dont la principale source est les huiles végétales.

I-2.3. Le marché mondial des huiles végétales

La production mondiale des huiles végétales tournait autour de 107 millions de tonnes en 2005 et atteignait les 135 millions de tonnes en 2008. Cette production est dominée par la production de quatre oléagineux à savoir le palme, le soja, le colza et le tournesol (figure I.3.) [22].

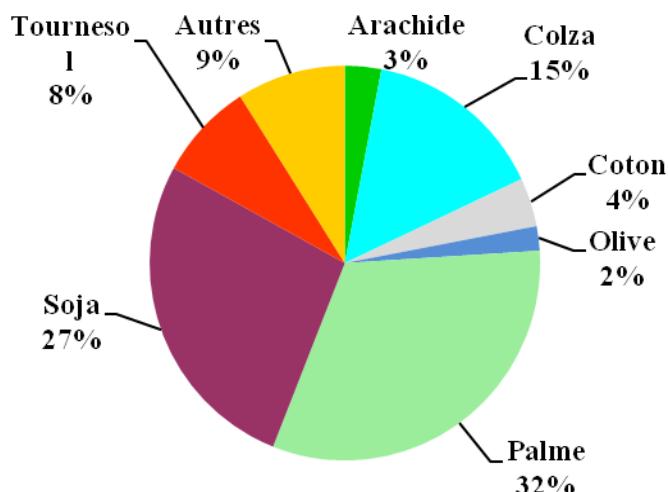


Figure I. 3 : Production mondiale d'huiles & de graisses végétales

La production africaine des huiles végétales est essentiellement fournie par le palmier oleique, le coton, l'arachide et le maïs. Les besoins africains en huile et en tourteaux ne cessent de s'accroître du fait de l'augmentation de la population africaine et de l'élévation du niveau de vie.

Les pays de la sous région regorgent de nombreux autres oléagineux rentrant généralement dans le régime alimentaire des populations, mais inexploités à l'échelle industrielle en Afrique centrale. Ce sont entre autres : l'avocat (*Persea americana*), le safou (*Dacryodes edulis*), la noix de coco (*Cocos nucifera*), le sésame (*Sesamum indicum*), le « djansang » (*Ricinodendron heudelotii*), la courge (*Cucumeropsis manii*), le « mbeu » (*Canarium schweinfurthii*), le karité (*Butyrospermum parkii*) [20].

I-3. Biosynthèse des composés terpéniques et des composés glycérolipidiques

Les huiles essentielles et les lipides de réserve sont des produits naturels qui émanent du processus de la photosynthèse, en passant par le métabolisme des sucres et la production de l'acide pyruvique qui se transforme en acétyl coenzyme A [23, 24]. Ce composé est un point d'ancrage pour la formation des composés terpéniques et des composés lipidiques.

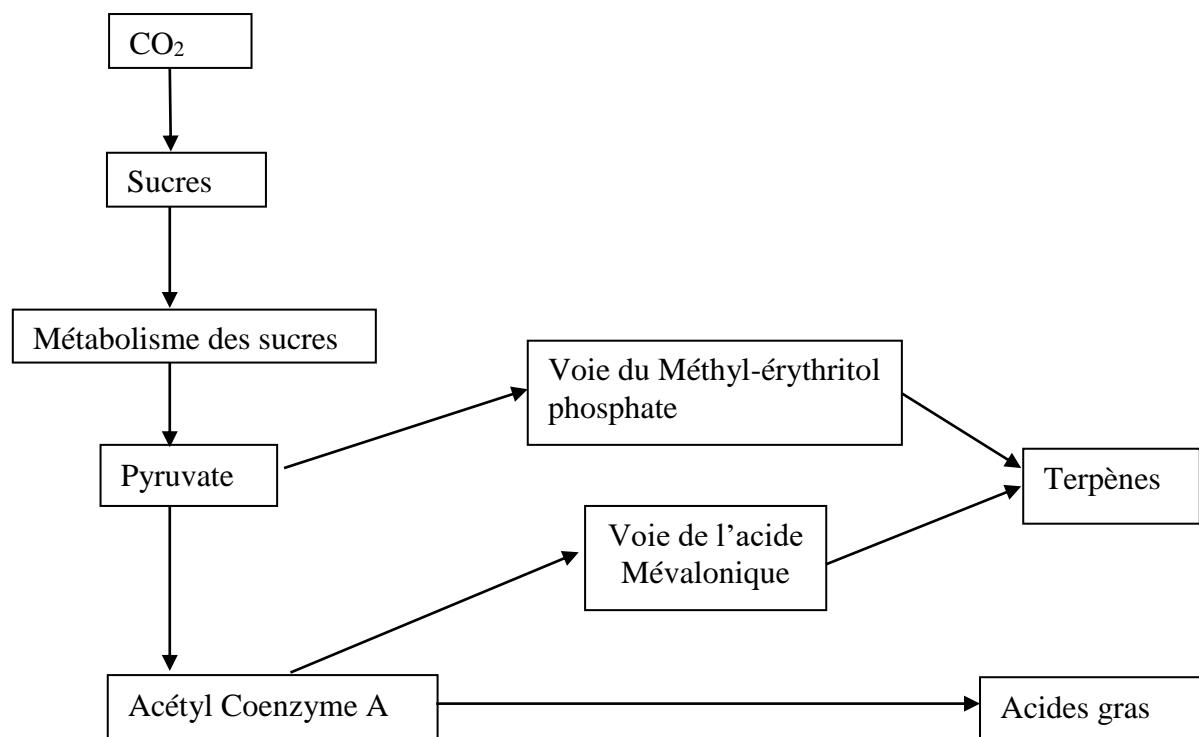


Figure I.4 : Voie de biosynthèse des terpènes et des acides gras.

L'isopentényl diphosphate (IPP) est l'intermédiaire clé dans la formation des composés terpéniques qui par des condensations et réarrangement produisent les composés des huiles essentielles. La voie la plus couramment admise pour la synthèse de la molécule d'IPP consiste en la condensation de deux molécules d'acétyl CoA pour former de l'acétoacétyl CoA et l'acide mévalonique. Les systèmes enzymatiques situés en aval de l'acide mévalonique permettent l'elongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout un éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones (figure I.4).

Ces réactions de conversion de l'IPP en composés terpéniques peuvent se faire dans trois compartiments cellulaires : les plastes, les mitochondries et le cytoplasme ; impliquant que l'IPP isomérase est présente dans chacun d'eux.

D'une manière générale, la biosynthèse des terpènes et des terpenoïdes suit trois étapes fondamentales [2] :

- l'étape initiale correspond à une condensation aldolique de l'acétylcoenzyme A sur l'acétoacétylcoenzyme A conduisant à la formation du (3S)-3-hydroxy-3-méthyl-glutarylcoenzyme A. Ce dernier serait ensuite réduit en acide (3R)-mévalonique MVA.
- la deuxième étape débute par la conversion du MVA en pyrophosphate d'isopentényle (PPI) qui s'isomérise selon un processus réversible en pyrophosphate de diméthylallyle (PPDMA), espèce plus réactive et susceptible d'alkyler divers sites nucléophiles. Elle s'achève par la condensation "Tête-à-Queue" des deux unités en C5: PPI et PPMA et conduit à la formation du pyrophosphate de géranyle (PPG).
- la troisième étape regroupe les condensations "Tête-à-Queue" ou "Tête-à-Tête" à partir du GPP et différentes autres isomérisations.

Les lipides de réserve sont obtenus par une autre voie métabolique (figure I.5), la condensation linéaire d'unités d'acétyl coenzyme A donne les acides gras, qui feront les piliers de la constitution des composés lipidiques [23].

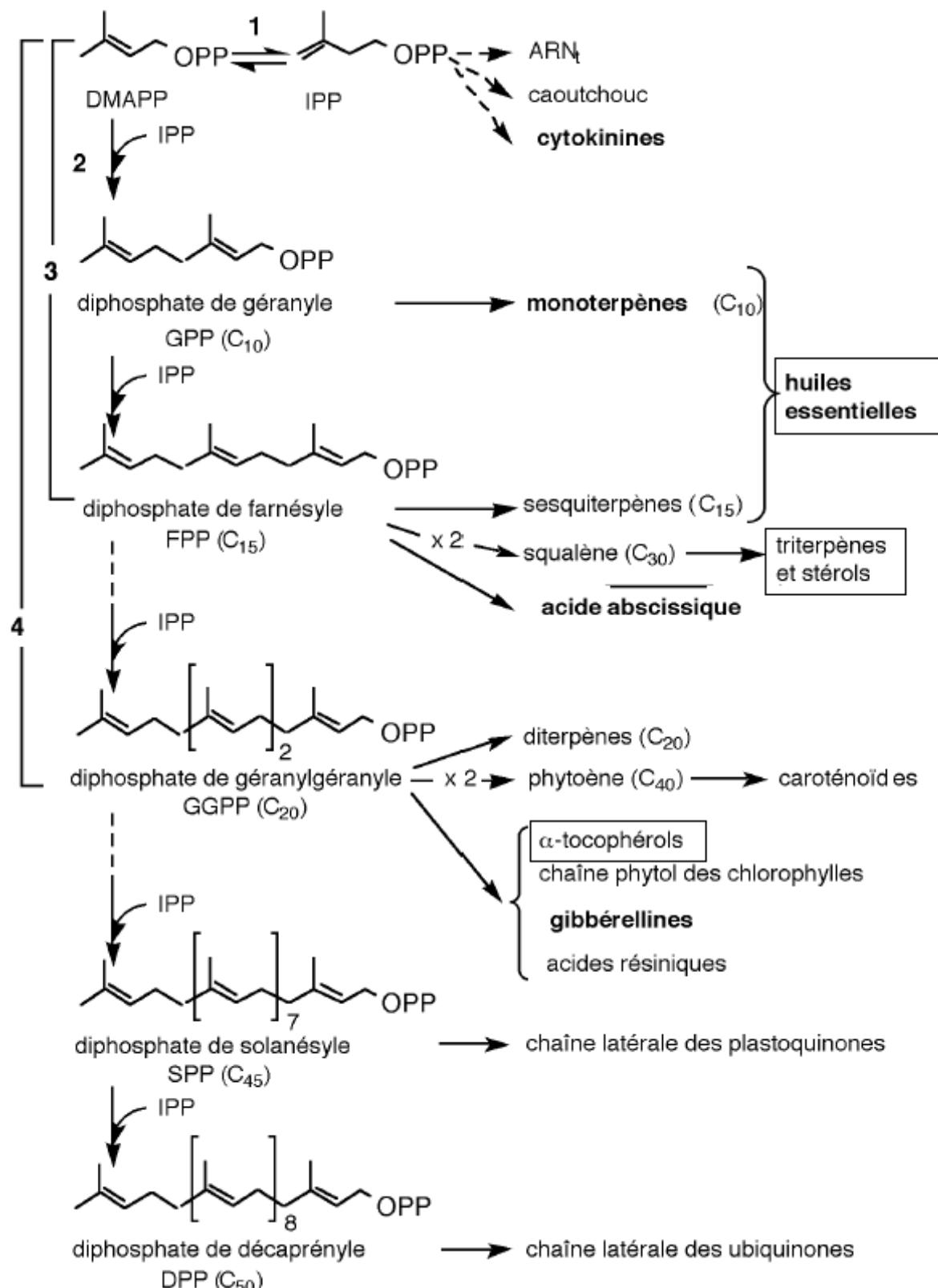


Figure I.5 : Mode d'elongation des processus terpéniques à partir du chaînon élémentaire, le diphosphate d'isopentényle (IPP)

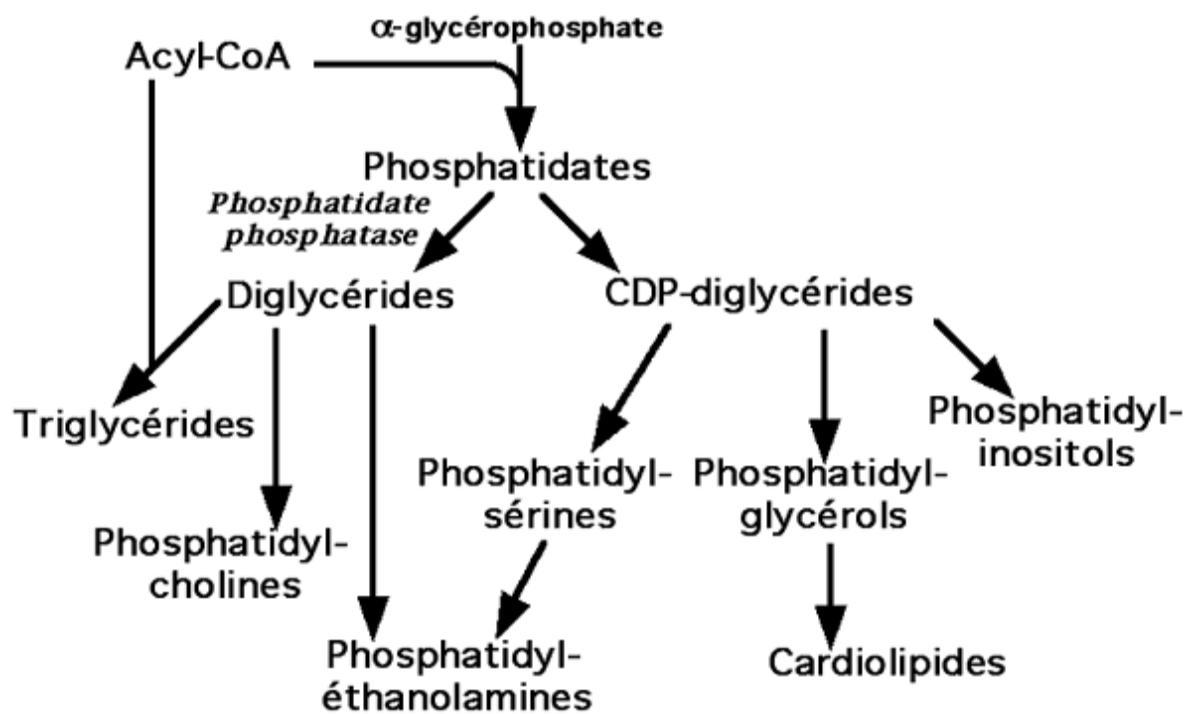


Figure I.6 : Biosynthèse des composés lipidiques, (Voie de Kennedy)

II- LES PLANTES A HUILES ESSENTIELLES ET/OU A LIPIDES DE RESERVE

Il existe un très grand nombre de plantes susceptibles de fournir des huiles essentielles et des lipides de réserve. Plusieurs plantes à fruits et graines sont connus pour leur fort taux et production en lipides de réserve. Diverses espèces oléagineuses sont présentées dans les travaux de Ayerdi [25] ; ainsi que la teneur en huile et la composition relative en acides gras qu'elles produisent. D'autres espèces sont connues pour la production des huiles essentielles : c'est le cas du thym (*T. vulgaris*), du girofle (*S. aromaticum*), de la citronnelle de Java (*C. winterianus*), de la mélisse (*Melissia officinale*), l'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*). Mais il arrive que différentes parties ou organes d'une même plante soient sollicités pour une production d'huiles essentielles ou de lipides de réserve.

La littérature fait état de très peu de plantes connues pour une production d'huile essentielle et de lipide de réserve à partir d'un même organe.

Nous regroupons dans le tableau I.3 quelques espèces connues pour leur production en huiles essentielles et en lipides de réserve. La composition relative en acides gras et en composés aromatiques majeurs y est représentée pour des espèces qui donnent à la fois les huiles essentielles et les lipides de réserve à partir de la même matrice (graines).

Tableau I. 3: Présentation de quelques plantes productrices d'huiles essentielles et de lipides de réserves

Espèces	HE (g kg ⁻¹)	HV (g kg ⁻¹)	Composés aromatiques majoritaires (%)	Acides gras majoritaires (%)	References
"Custard-apple" (<i>Annona senegalensis</i>)	1 ^b , 2 ^a	131 ^b	Elemol (17,8 ^a ; 13,2 ^b -35 ^b) E-β-caryophyllene (14,9 ^a) β-phellandrene (11,9 ^a) β-eudesmol (11,3 ^a ;14 ^b -19,9 ^b)	C16:0 (20,4 ^a) C18:1n9 (60,2 ^a)	[26-28]
"Carvi" (<i>Carum carvi</i> L.)	20 ^a -56 ^a , 66 ^b	8 ^a -12 ^a	Carvone (38 ^b ; 60 ^a -83 ^a) Limonene (2,6 ^b ; 1,3 ^a -37 ^a)	C18:1n12 (31 ^a -38 ^a) C18:2n6 (31 ^a)	[29-31]
"Coriandre" (<i>Coriandrum sativum</i>)	3,2 ^b , 6,8 ^a	192 ^b , 226 ^a	Linalool (91 ^a , 24 ^b -86 ^b) Camphor (2 ^a ,2 ^b -7 ^b)	C18:1n12 (67 ^a -76 ^a),(42 ^b -75 ^b) C18:2n6 (13 ^a -15 ^a), (13 ^b -18 ^b)	[32, 33]
"Fennel" ou "Fenouil" (<i>Foeniculum vulgare</i>)	4 ^b , 13 ^b	20 ^b -30 ^b	Fenchone (31 ^b) α-Phellendrene (17 ^b) Anethol (50-80 ^b)	C18:3n3 (17 ^b -43 ^b) C18:2n6 (23 ^b -40 ^b)	[34-37]
"Black cumin" ou "Nigella" (<i>Nigella sativa</i>)	4 ^a -25 ^a	250 ^a -440 ^a	P-cymene (15 ^a) Limonene (4 ^a) Carvone (4 ^a)	C16:0 (8 ^a -14 ^a) C18:1n9 (19 ^a -25 ^a) C18:2n6 (47 ^a -70 ^a)	[38-40]
"Karafs-koohi" (<i>Kelussia odoratissima</i>)	21 ^a	250 ^a	Z-ligustilide (51 ^a) δ-terpinen-7-al (10,3 ^a)	C18:1n-12 (72,3 ^a) C18:2n6 (19 ^a)	[8, 41]
HE: huile essentielle; HV: huile végétale; (a) graines; (b) fruits ; C18:3n3 (acide linolénique) ; C18:2n6 (acide linoléique) ; C18:1n9 (acide oléique) ; C18:1n12 (acide petroselenique) ;					

III- ZONE D'ETUDE ET CONNAISSANCE DES QUATRE ESPECES A FRUITS SAISONNIERS DU CONGO-BRAZZAVILLE

III-1. Présentation de la zone d'étude

La région Afrique Centrale renferme une part importante de la biodiversité avec des ressources végétales encore inexploitées. Le Congo est l'un des pays de la zone d'Afrique Centrale qui possède une végétation extrêmement variée avec divers types de savanes et des forêts très différentes, qui conservent leur intérêt scientifique et socio – économique.

Le Congo a été pour nous un cas d'exemple et un point de départ d'investigation des ressources de la région Afrique Centrale du fait de sa position géographique, de la nature et de sa flore moins bien connue (figure I.7.).

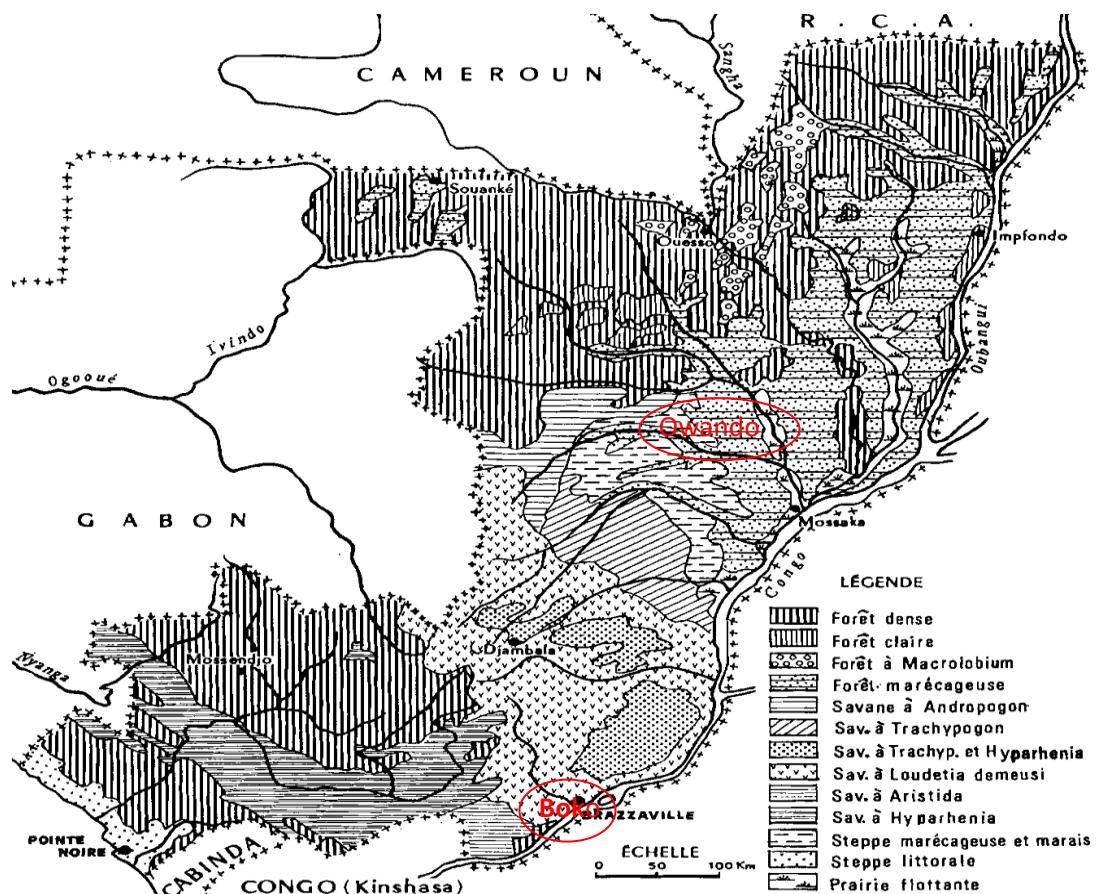


Figure I. 2: Principaux types de végétation au Congo d'après B. Descoings et B. Rollet[42].

III-2. Connaissance des quatre plantes à fruits saisonniers du Congo

Les études réalisées par Ouamba [43] portant sur la valorisation chimique de 12 plantes aromatiques africaines appartenant à 5 familles, ont permis de sélectionner deux espèces du genre *Aframomum* (*Zingiberaceae*) souvent rencontrées au Congo-Brazzaville pour le lancement de ce vaste projet de recherche, au regard de leur potentiel de production en huiles essentielles. Il s'agit de : *Aframomum giganteum* (Oliv. & Hanb) K. Schum et *Aframomum stipulatum* (Gagnep) K. Schum.

Les travaux de Wong et de Augustin sur quelques fruits [44-46] nous ont guidé pour retenir *Nephelium lappaceum* L. de la famille des *Sapindaceae* et le *Spondias mombin* L. de la famille des *Anacardiaceae*. Ce sont des plantes pérennes, dont les fruits sont saisonniers.

III-2.1. Description botanique, usages traditionnels et travaux antérieurs sur les espèces du genre *Aframomum*

III-2.1.1. Rappel sur la famille des Zingiberaceae

C'est une famille tropicale et subtropicale qui comprend plus de 1400 espèces réparties dans environ 80 genres. En Afrique Centrale et en Afrique de l'Ouest on rencontre approximativement 50 espèces [42, 47, 48]. Ce sont des plantes vivaces et toute partie de la plante présente un fort caractère aromatique quand elle est écrasée [49] et beaucoup d'espèces de cette famille sont communément utilisées pour la préparation des recettes médicinales et la production des huiles essentielles.

Cette famille est faiblement représentée au Congo, 4 genres ont été repertoriés : *Zingiber*, *Aframomum*, *Costus* et *Renealmia*. Le genre *Aframomum* est le plus rencontré au Congo : 15 espèces ont déjà été inventoriées ; il s'agit de *alboviolaceum*, *citratum*, *giganteum*, *hanburyi*, *masuanum*, *melegueta*, *stipulatum*, *baumannii*, *daniellii*, *elliottii*, *geocarpum*, *le-testuanum*, *longipetiolatum*, *subsericeum*, *paradisii* [39, 45].

Les fruits de deux plantes (*Aframomum giganteum* et *Aframomum stipulatum*) ont été choisis sur la base de leur caractère saisonnier, de leur production connue en huile essentielle et de l'absence de données bibliographiques relatives à l'apport lipidique de ces fruits.

III-2.1.2. Espèce *Aframomum gigantem* (Oliv&Hanb) K. Schum

a) Noms et position systématique

a.1. Noms vernaculaires ou locaux :

- *ntundu* (Sud Congo)
- *tondolo* (Nord Congo)

a.2. Position systématique (APG II) :

- Règne : *Plantae*
- Taxon: *Spermaphyte*
- Division : *Magnoliophyta*
- Embranchement: *Angiosperme*
- Classe : *Liliopsida*
- Sous classe : Zingiberidae
- Ordre : *Zingiberales*
- Famille : *Zingiberaceae*
- Genre : *Aframomum*
- Espèce : *Aframomum giganteum*
- Synonyme : *Aframomum giganteum* K. Schum (1904), *Amomum giganteum* (Oliver & Hanbury) (1964).

b) Description botanique

L'espèce *Aframomum giganteum* est une très grande herbe à rhizome rampant. La tige est feuillée jusqu'à 6 cm de haut et les pétioles atteignent 1,5 cm de long. Le limbe longuement elliptique est acuminé au sommet, glabre sur les deux faces. La ligule coriace, obtuse, a 1 cm de long. Les inflorescences sont en grappe, l'axe primaire portant latéralement un nombre variable d'épis pluriflores. Les bractées sont imbriquées, obtuses à émarginées, mucronées sous le sommet. Les fleurs sont rouges, les fruits lisses, les graines noires (figure I.8) [50].

C'est une plante de sous-bois de forêts denses, formant souvent des fourrés épais. Sa présence indiquerait des terres propices à la culture du cacaoyer.



Figure I.8 : Représentation de plante de *Aframomum giganteum* (Oliv & Hanb) K. Schum

c) Usages traditionnels

Au Congo [40, 45, 48], les feuilles de *Aframomum giganteum* servent à couvrir les cases. Les fruits rouges sont comestibles. Divers usages thérapeutiques sont connus : purgatif et antihelminthique (graines), maux de dents (rhizomes). Les fruits coupés et pressés donnent un liquide qui sert de collyre pour soigner diverses ophtalmies ; en grattant l'endocarpe on obtient une pâte qui, mélangée à du sel gemme, sert à détruire les filaires localisées dans les muqueuses de l'œil. Le suc du rhizome frais écrasé est instillé dans les yeux pour traiter la conjonctivite. Le suc des tiges entre dans la préparation du poison de flèche à base de *Strophanchus*. Les feuilles écrasées sont utilisées pour la cicatrisation des blessures et le jus ou le décocté des feuilles constitue une potion calmante de la toux et des douleurs de la poitrine.

Au Gabon, les Basango utilise l'extrait de la tige pour traiter les problèmes des vers intestinaux[51]. La population Eschira du Gabon se sert des graines du fruit comme un antihelminthique, la pulpe du fruit comme un léger laxatif et les rhizomes macérés pour traitement des maux de dents.

Plusieurs auteurs signalent l'utilisation des différentes parties de *Aframomum giganteum* par les populations de gorilles dans les pays d'Afrique Centrale[52].

d) Etudes et travaux antérieurs

En 1981, De Bernardi et coll. [53], présente les résultats d'une étude où 47 composés volatils ont été identifiés dans l'huile essentielle de *Aframomum giganteum*, le linalol et acéate de linalyle sont montrés comme responsables de l'odeur caractéristique de la tige.

En 1991, Ouamba [43] étudie un échantillon de graines de *Aframomum giganteum* provenant de la forêt de Bangou (Sud du Congo), dont l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation à une teneur de 1,5 % est plutôt riche à 94,8 % de monoterpènes avec comme composés majeurs le β -pinène (50,3%), le 1,8-cinéole (23,4%) et le limonène (4,5%). On note parmi les rares sesquiterpènes identifiés du α -sélinène à un taux de 3,5 % et une nette absence de linalol et d'acéate de linalyle.

A des fins de comparaison, Ouamba rapporte les travaux réalisés sur la composition chimique des huiles essentielles des genres *Aframomum* et *Amomum* d'origines géographiques diverses [43].

Menut et Coll. [54] montrent qu'il n'est pas possible de distinguer ces deux genres d'après les constituants principaux de leurs essences et proposent pour les différentes espèces étudiées une classification chimiotaxonomique en cinq types.

Abondo et Amvam Zollo signalent dans leur étude en 1995, la présence de l'isopinocamphone, connu pour des effets psychodysleptiques dans les feuilles de *A. giganteum* [55].

Une étude faite en 1996 montre que *A. giganteum* contient deux flavonoïdes, le quercétin et le kaempferol, qui présentent une activité antibactérienne contre certains levures et moisissures. Ils affichent aussi des réponses fortes de l'activité antivirale et sont anti-inflammatoires. La présence de l'acide syringique a été aussi signalée, anesthésique local à action anti-Parkinson spécifique [52, 56].

Agnaniet H. et coll. (2004) présentent une composition chimique des huiles essentielles des feuilles et rhizomes de *A. giganteum* (K. Schum) du Gabon, respectivement obtenues à des teneurs de 0,5 et 0,27 %, et évaluent l'activité antioxydante de ces essences. Les composés majeurs de l'huile essentielle des feuilles est le cis-pinocamphone (54%) et pinocarvone (10,1%), alors que les rhizomes contiennent 10,5 % de β -caryophyllène et 30,4% d'oxyde de caryophyllène [57].

III-2.1.3. Espèce *Aframomum stipulatum* (Gagnep) K. Schum

a) Noms et position systématique

a.1. Noms vernaculaires ou locaux :

- *ntundu za makanga* (Sud Congo)
- *tondolo* (Nord Congo)

a.2. Position systématique (APG II) :

- Règne : *Plantae*
- Taxon: *Spermaphyte*
- Division : *Magnoliophyta*
- Embranchement: *Angiosperme*
- Classe : *Liliopsida*
- Sous classe : Zingiberidae
- Ordre : *Zingiberales*
- Famille : *Zingiberaceae*
- Genre : *Aframomum*
- Espèce : *Aframomum stipulatum*
- Synonyme : *Amomum alboviolaceum* Ridl. (1887); *Aframomum alboviolaceum* (Ridl.) K.Schum. (1904).

b) Description botanique

C'est une herbe à stolons rampants qui porte des tiges feuillées atteignant 1,5 m de haut et dont les feuilles sont sessiles, à limbe étroitement lancéolé, aigu aux deux extrémités, glabres, mais à marges légèrement scabres. La ligule bifide a des lobes aigus d'environ 1 cm de long et 2 mm de large à la base. Les inflorescences sont en épis pauciflores, solitaires ou par deux à la base des tiges; le pédoncule est court. Les bractées inférieures sont vertes, les supérieures teintées de rouge. La calice est spathacée; la corolle, rose à mauve pâle, à lobes aigus. Le labelle de même teinte, étalé, arrondi, est obtusément cunéiforme au sommet, a bords sinueux. Le connectif staminal à lobe médian, est pratiquement nul, tronqué. L'ovaire est glabre, les fruits sont rouges; les graines sont lisses et noires (figure I.9) [50].

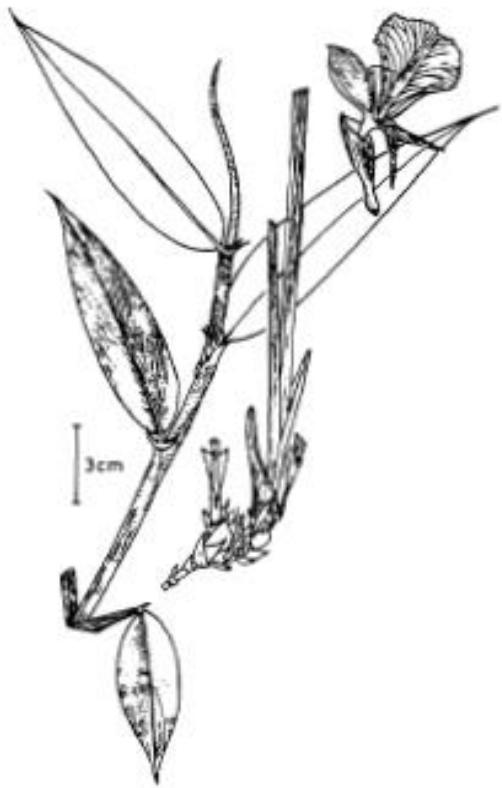


Figure I.9 : Représentation de la plante de *Aframomum stipulatum* (Gagnep) K. Schum [40]

c) Usages traditionnels

Divers usages de *A. stipulatum* sont connus : le suc du rhizome frais écrasé est instillé pour calmer la céphalgie et la conjonctivite. La décoction aqueuse des tiges est prescrite en boisson, en bain et bains de vapeur contre les maux de ventre des femmes pour favoriser l'expulsion du placenta et comme anti-diarrhéique. Le jus des fruits ou des feuilles est employé comme collyre pour soigner diverses affections oculaires [43].

La plante entière de *A. alboviolaceum* est utilisée pour la protection contre les mauvais esprits et dans les rites spirituels. Les graines écrasées servent comme ingrédients dans des préparations traditionnelles [49].

Les résultats d'une investigation menés au Congo-démocratique (Kinshasa) montrent l'usage des feuilles de *A. alboviolaceum* (Ridl.) K.Schum pour traiter la difficulté de vision, la fièvre, les maux de tête et d'estomac, la toux, les amibes et les hémorroïdes [58]

d) Etudes et travaux antérieurs

Plusieurs études faites sur *A. stipulatum* portent sur son potentiel en huiles essentielles.

En 1991, Ouamba obtient, à des teneurs comprises entre 0,1 et 0,2 % des huiles essentielles des graines de *Aframomum stipulatum* du Congo, qui présentaient en moyenne des

compositions chimiques voisines : les monoterpènes prédominent (75%) avec comme composés majeurs le β -pinène (45,0%), le 1,8-cineole (11,5%) [40], et à faibles quantités, des composés oxygénés bicycliques dérivés du pinane : pinocarvéols, pinocarvone, isopinocamphone, myrténal, myrténol.

Les travaux de Ouamba relèvent aussi, dans l'un des échantillons, la présence de l'heptan-2-ol et de son acétate, également identifiés, par le même auteur, dans les huiles essentielles de l'espèce *A. melegueta*. Parmi les sesquiterpènes, le β -caryophyllène (9,3 %) et l' α -humulène (7,1 %) sont les plus abondants.

Abondo et Amvam Zollo, dans une étude réalisée en 1995 [55], signalent que la voie de synthèse des composés de l'huile essentielle des feuilles de *A. alboviolaceum* serait celle du 1,8-cineole. Ces auteurs présentent une classification des *Aframomum* selon leurs usages. Ainsi l'espèce *A. alboviolaceum* aurait un usage alimentaire (feuilles) et un usage médicinal (graines).

En 1997, une étude réalisée sur les rhizomes de *Aframomum alboviolaceum* fait état des composés volatils dans un extrait hexanique ; le fractionnement de cet extrait a permis l'identification de 26 composés volatils et l'isolement de deux composés : (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial (un diterpène) et (+)-intermedeol (un sequiterpène) [59].

En 2002 Cimanga et coll. [60] rapportent que les feuilles de *A. stipulatum* contiennent 0,25 % d'une huile essentielle dont la composition chimique est marquée par le thymol (34 %), l'eugénol (7,2%), le p-cymène (6,2%) et le limonène (4,5%). Cet échantillon d'huile essentielle présente une activité antibactérienne sur une large gamme de bactéries.

III-2.2. Description botanique, usages traditionnels et travaux antérieurs sur l'espèce *Spondias mombin* Linn. (Anacardiaceae)

III-2.2.1. Rappel sur la famille des Anacardiaceae

La famille des *Anacardiaceae* renferme près de 77 genres et environs 600 espèces dont pour la plupart, les fruits sont drupacés à mésocarpe résineux.

Les espèces de cette famille sont des arbres, des arbustes ou des lianes à feuilles alternes, composées et imparipennées, que l'on rencontre surtout dans les régions tropicales à subtropicales et dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord.

De nombreuses espèces de cette famille sont bien connues pour leurs fruits et graines comestibles (mangues, pistaches, noix de Cajou) [61].

Notre étude s'est focalisée sur l'espèce *Spondias mombin L.*

III-2.2.2. Espèce Spondias mombin Linn.

a) Noms et position systématique

a.1. Nom courant :

- *Prunier mombin*
- *Mombin jaune*

a.2. Nom vernaculaire (local) :

- *Minguéngué*

a.3. Position systématique (AGP II) :

- Règne : *Plantae*
- Embranchement : *Spermatophyte*
- Taxon: *Spermaphyte*
- Division : *Magnoliophyta*
- Embranchement : *Angiosperme*
- Classe : *Eudicotylédones*
- Sous classe : *Rosidae*
- Ordre : *Sapindales*
- Famille : *Anacardiaceae*
- Tribu : *Spondiadeae*
- Genre : *Spondias*
- Espèce : *Spondias mombin*
- Synonyme : *Spondias lutea* L. (1762), *Spondias dubia* A. Rich. (1831), *Spondias oghihee* G. Don. (1832), *Spondias pseudomyrobalanus* Tuss.

b) Description botanique

Spondias mombin comme *Anacardium occidentale* et *Mangifera indica* sont des espèces introduites. *Spondias mombin* appartient au genre *Spondias*, qui compte environ 10 espèces originaire d'Indomalaisie et d'Amérique tropicale. Duvall affirme que la plante serait d'origine africaine (figure I.10) [62].

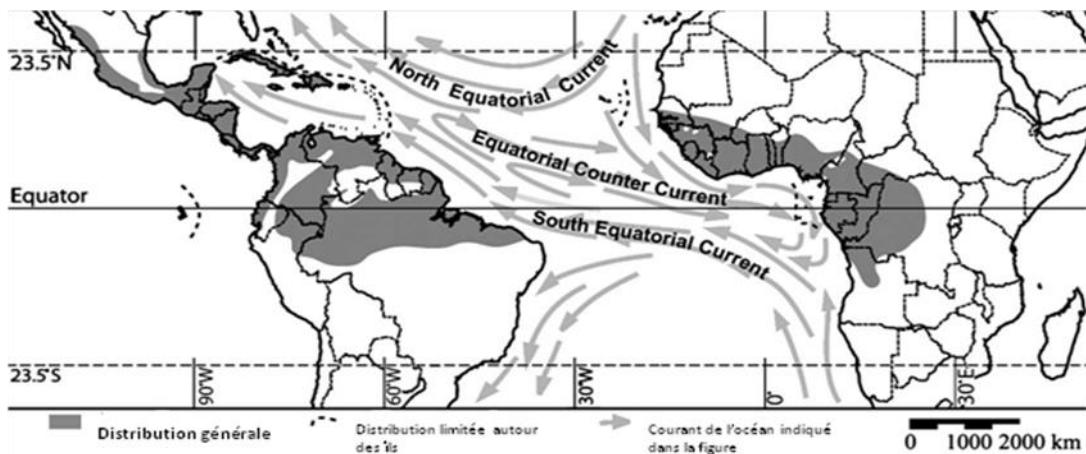


Figure I. 3: Distribution de l'espèce *Spondias mombin* L. [62]

Spondias mombin est un arbre à cime hémisphérique et assez ouverte atteignant 15 m de haut. Le tronc peut mesurer jusqu'à 50 cm de diamètre. On note parfois la présence de petits contreforts au pied des individus âgés. L'écorce est profondément marquée de crevasses longitudinales, à crêtes épaisses et rugueuses, brun clair, à tranche rouge striée de blanc. Les feuilles alternes, imparipennées, plutôt regroupées au bout des rameaux, atteignent 60 cm de long, avec 5 à 8 paires de folioles opposées ou alternes ; le limbe glabre, parfois pubérulente, oblongue elliptique, asymétrique.

L'inflorescence est en panicule lâche terminale de 10-20 cm de long. Les fleurs sont blanches, odorantes, de 10-12 mm de diamètre possèdent un calice à 5 lobes et une corolle à 5 pétales. Le fruit est une drupe ellipsoïde ou ovoïde, jaune à maturité, à chair astringente, sucrée, plus ou moins acidulée (figure I.11).



Figure I. 4: Représentation de la plante et du fruit de *Spondias mombin* L.

c) Usages traditionnels

Spondias mombin présenterait les mêmes usages en médecine traditionnelle que le manguier.

En effet, les feuilles de *Spondias mombin* associées au citron constituent un remède présumé efficace contre la fièvre [61].

Cette plante est une véritable panacée : le macéré des feuilles fraîches passe pour soigner les métrorragies de la femme enceinte, la blennorragie, l'anurie, la varicelle et les candidoses ; le suc en instillations oculaires soulage les céphalées. Le décocté des feuilles en bain de vapeur traite les crises convulsives et le tétanos [50].

Les racines interviennent dans le traitement des spasmes, les feuilles dans celui des hémorragies et la rétention d'urine [61, 63]. Une étude menée sur l'espèce de Côte d'Ivoire rapporte que *S. mombin* traite la pathologie de fontanelle [64].

La pulpe du fruit de *S. mombin* entre dans la confection de diverses boissons et des alcools. Elle est utilisée dans la préparation de bouillies de sorgho en milieux Tem et Kabyè au Togo. Elle est aussi utilisée dans la production de confitures [65].

Dans les villages du Sud du Congo et au Togo, l'espèce *Spondias mombin* est utilisée comme arbre de clôtures. Elle est aussi repiquée, dans les centres urbains, dans des domiciles privés, pour ses fruits très appréciés par les enfants et vendus dans les marchés [61, 66, 67].

d) Etudes et travaux antérieurs

De nombreux travaux scientifiques ont été réalisés sur les feuilles de *Spondias mombin* L..

Dès 1989, les extraits aqueux des feuilles de *S. mombin*, utilisés traditionnellement pour l'expulsion du placenta, ont fait l'objet d'étude [68]. Cette étude a permis d'identifier les saponines comme responsables de cet effet.

Une étude mené par Abo et coll. met en évidence l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles et des écorces de *Spondias mombin* sur un large spectre de souches bactériennes [69].

Les travaux rapportés par Hope montrent que l'extrait des feuilles de *Spondias mombin* L. présente une bonne activité contre *Plasmodium falciparum* [70, 71].

Ayoka et coll. ont également menés des études sur les effets sédatifs, antiépileptiques et antipsychotiques de *S. mombin* sur les souris et les rats [72] ; ils ont montré que les extraits des feuilles de cette plante contient des composés antagoniste au GABA et qu'ils ont effectivement des effets sédatifs et anti-dopaminergiques prononcés.

Les études phytochimiques sur les feuilles de *S. mombin* mettent en évidence la présence de grande famille de composés chimiques comme les tanins, les saponosides, les flavonoïdes et les alcaloïdes [73, 74]. Ces auteurs notent la présence de quelques vitamines (acide ascorbique, acide nicotinique, riboflavine et thiamine). L'analyse minérale révèle dans la feuille, la présence du K, Mg, Na, Ca, Se, Fe et P.

Bora P.S. et coll. [75] rapportent, à la suite de leurs travaux, que le poids de la pulpe pendant l'étape de maturation du fruit, peut passer de vert mûr (40,67%) à l'étape mûre (59,67%) tandis que l'on n'a pas une variation considérable du poids de la peau et de la graine. La quantité en sucres réducteurs est plus élevée dans le fruit à moitié mûr (6,02 %) que dans le fruit vert (4,81 %) et le fruit mûr (5,21%).

Une première étude de caractérisation de l'huile extraite de graines de *Spondias mombin* a été entreprise par Eromosele et Paschal [76]. Cette étude indique une teneur de 31% en poids avec des valeurs respectives d'indice de peroxyde et de saponification de $6,0 \text{ mEqkg}^{-1}$ et 1,68 mg KOH de cette huile.

En 2003, les extraits de deux variétés de *Spondias mombin* obtenus par deux techniques différentes : les techniques de Solid Phase Microextraction (SPME) et de Simultaneous Distillation and Extraction (SDE). L'analyse de l'extrait de la variété *tapereba* obtenu par la technique SPME montre que les constituants majoritaires sont : (E)-caryophyllene (18,7%), l'ethyl butyrate (10,0%), l'ethyl hexanoate (7,0%) alors que l'extrait obtenu par la technique SDE est plutôt riche en (Z)-caryophyllene (13.2%) et le limonène (9,5 %). Une analyse des extraits de la variété *caya* donne comme composés majoritaires le myrcène (41,1%) et le β -phellandrine (8,5%) par la technique SPME et le myrcene (38.0%) et p-cymene (6.2%) par la technique SDE [77].

Narain N. et coll. [78] montrent dans une étude réalisée en 2007 sur les composés volatils de la pulpe de fruit de *S.mombin* du Brésil à différentes étapes de maturation que le β -caryophyllène (14,1-22,2 %), le 2-methyl butanal (19,3-28,4 %), le 2-hexanol (15,0-18.6 %), sont les constituants majeurs de cette partie de la plante.

Les travaux sur la composition nutritive de la pulpe de fruit frais, menés en 2009 par Adepoju [79], montrent que cet organe contient en g/100g : des protéines (2,6), des lipides (2,0), des fibres (4,2), de la cendre (1,0), des carbohydrates totaux (7,9), des sucres solubles totaux (4,7) et d'eau (82,3). Ces auteurs ont également noté la présence de quelques minéraux (K, Na, Ca, P, Fe, Zn, Cu,) et des composés vitaminiques (acide ascorbique, 34 mg/100g ; niacine, 0,5 mg/100g ; riboflavine, 0,07 mg/100g ; β -carotène, 85 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$).

En 2006, les travaux entrepris sur quelques plantes ligneuses de cueillette de la ville d'Abidjan montrent un potentiel prometteur de l'activité antibactérienne des extraits dichlorométhaniques des fruits de *S. mombin* sur les bactéries multirésistantes telles que *Staphylococcus aureus* méthycillino-résistant (SAMR) et *S. aureus* de résistance MLS_B [80].

Tiburski J.H. et coll. [81] identifient en 2011 cinq caroténoïdes dans la pulpe du fruit : β -cryptoxanthin, lutein, zeinoxanthin, α et β -carotene. Ils mentionnent que 100 g de pulpe de

Spondias mombin peuvent fournir 37% de l'apport journalier recommandé en vitamine A. La présence de polyphénols manifestant une activité antioxydante de 17.5 mmol TEAC.g⁻¹ a été également observé lors de cette étude.

III-2.3. Description botanique, usages traditionnels et travaux antérieurs sur l'espèce

***Nephelium lappaceum* Linn. (Sapindaceae)**

III-2.3.1. Rappel sur la famille des Sapindaceae

La famille des *Sapindaceae* est une famille tropicale ou subtropicale comprenant des espèces ligneuses, le plus souvent des arbres ou des arbustes, parfois des lianes. Elle compte près de 150 genres et 1500 espèces.

De nombreuses espèces de cette famille sont riches en saponines dans certains de leurs organes [82]. Ces plantes (*Litchi chinensis*, *Pavieasia kwangsiensis*, *Pometia pinnata*, *Nephelium lappaceum* et *Dimocarpus longan*) donnent des fruits qui contiennent un arille charnue et comestible.

Dans cette famille, nous nous sommes intéressés à *Nephelium lappaceum L*

III-2.3.2. Espèce *Nephelium lappaceum* Linn.

a) Noms et position systématique

a.1. Nom courant (Références) :

- *Ramboutan*
- *litchi à poils*

a.2. Nom local (Références) :

- *litchi*

a.3. Position systématique (APG II) :

- Règne : *Plantae*
- Embranchement : *Spermatophyta*
- Division : *Magnoliophyta*
- Classe : *Magnoliosida (Dicotyledone)*
- Ordre : *Sapindales (Rosidae)*
- Famille : *Sapindaceae*
- Genre : *Nephelium*

- Espèce : *lappaceum*
- Synonyme : *Nephelium lappaceum* L. (1767)

b) Description botanique

Nephelium lappaceum connu sous le nom de Ramboutan est une espèce importée ou introduite en Afrique. Elle serait originaire d'Asie (Malaisie –Indonésie) [83]. Cette espèce appartient au genre *Nephelium* qui regroupe près de 25 espèces. Les espèces les plus connues et proches morphologiquement du *Nephelium lappaceum* sont le pulasan (*Nephelium mutabile* Blume), le litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) et le longan (*Dimocarpus longan*) [84].

Nephelium lappaceum est un arbre qui peut atteindre des hauteurs allant de 10 à 20 m. C'est une espèce sexuée où l'on retrouve des pieds mâles, femelles et d'autres pouvant être hermaphrodites. Les femelles produisent des fruits de forme ovale qui, à maturité, ont des diamètres allant jusqu'à 8 cm et 3 à 5 cm de large. Le fruit de *Nephelium lappaceum* présente une teinte entre le jaune et rouge à maturité avec une peau recouverte de petit duvet [85] (figure I.12) ; c'est ainsi, qu'il est aussi appelé Litchi à poils.

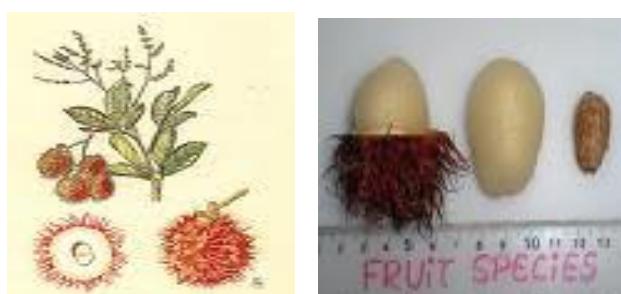


Figure I. 5: Planche de *Nephelium lappaceum* L. (a) ; Représentation du fruit (b).

La fructification du *N. lappaceum* commence vers mai et fini vers le mois d'octobre pour les pays d'Amérique Centrale (figure I.13). On note à peu près une durée de production de fruit de un à un mois et demi pour différents types d'arbre (tôt, normal et en retard) [84]. Au Congo, cette période de fructification est légèrement décalée, elle s'étend entre mi-septembre et décembre.

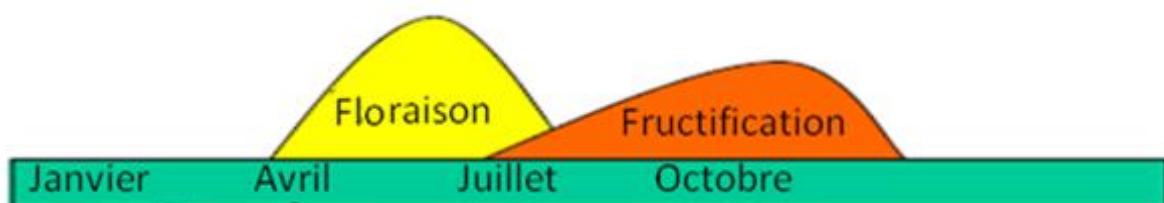


Figure I.13 : Cycle annuel de *Nephelium lappaceum*

c) Usages traditionnels

Les fruits sont appréciés frais ou en salade. Le grain cuit présente des propriétés narcotiques, antihelminthiques.

Les fruits sont utilisés pour faire des confitures et gelées. Le suif (graisse solide) du rambutan, comestible, est aussi utilisé pour faire des savons et des bougies. Les feuilles et les peaux de fruit sont utilisées comme colorant de teinture. Les racines servent à combattre la fièvre [86].

Au Congo, l'arbre de *Nephelium lappaceum* est rencontré dans les zones rurales comme arbre de clôture ou de délimitation des zones habitées. Les fruits sont vendus dans les marchés et consommés par la population comme fruit exotique.

d) Travaux antérieurs

Les travaux de Augustin et Chua en 1988 sur les graines de trois clones de *Nephelium lappaceum* ont montré qu'elles représentent 5-7 % de la masse des fruits et qu'elles peuvent contenir 37,1-38,9 % de lipides totaux, 11,9-14,1 % de protéine, 2,8-6,6 % fibre brute et 2,6-2,9 % de cendre par rapport à la matière sèche. L'analyse du profil en acides gras de la graine a montré que les constituants majeurs sont le C18:1 (37.91-40.15 %); C20:0 (36.14-36.77 %) [87]. Des résultats similaires ont présentés par Solis-Fuentes et coll. en 2010 sur la composition, et sur la stabilité thermique de graisse comestible naturelle des graines de *Nephelium lappaceum* L [83].

Les travaux présentés par Banerji et coll. (1984) et ceux de Shukla et coll. (1993) sur certaines espèces du genre *Nephelium* (*N. daedaleum*, *N. maingayi*, *N. mutabile*, *N. ramboutan-ake*) montrent que les huiles de leurs graines sont riche en acides oléique et arachidique avec des valeurs supérieures à 30 % [88, 89].

En 1998, Aitzetmüller et coll. relèvent la présence des triglycérides et des composés cyanolipides du type II et III dans les extraits au système ether/hexane 72 : 28 (v/v) et au toluène des graines de rambutan. [90].

Ong et coll. en 1998 ont identifié plus de 60 composés volatiles présentant des activités odorantes à partir des extraits de la chair ou de la pulpe de fruit avec du fréon et de l'acétate d'éthyle. D'après ces auteurs le β-damascenone, le 2-methylbutyrate d'éthyle, le 2,6-nonadienal, le (E)-2-nonenal, et le nonanal sont les principaux constituants responsables de l'arôme du fruit[91] .

En 2007, une étude réalisée sur les pelures de certains fruits montre que les extraits de pelures de fruits de *Nephelium* sont une source potentielle d'antioxydants avec des valeurs d' IC_{50} de 0,006 mg/ml, et qu'ils ont des propriétés non toxiques vis à vis des cellules normales [92].

Une étude réalisée en 2008 en Thaïlande, sur le potentiel des plantes à huile alimentaire en vue de la production des biodiésels par catalyse-enzymatique, montre que l'amande de *Nephelium lappaceum* donne de l'huile à une teneur de 41,3 % avec un profil acides gras majeurs de C18:1 (55,25), C20:0 (22,05), C16:0 (8,77), C18:0 (7,25), C18:2 (3,72). Une production en huile de 200 kg/ha peut produire jusqu'à 160 kg/ha de biodiesel. Les taux de conversion de trans-estérification par deux lipases (Novozyme 435 et Lipozyme RM IM) sont supérieurs à 80 % [93].

Les travaux de Pohlan et coll., en 2008, montrent que 100 g de fruit comestible du rambutan peuvent contenir des protéines (0,46 – 1,05 g), des lipides (0,1 à 0,45 g), des fibres (0,28 à 2,8 g), quelques minéraux comme le calcium, le magnésium, le potassium, le fer et le phosphore (12,9 – 30 mg), et l'acide ascorbique à des taux entre 30 et 70 mg [94].

Une autre étude de la même année montre que les extraits aqueux et surtout éthanoliques des peaux ont une activité antioxydante bien supérieure à celle de la pulpe et amande de fruit [95]. En 2010, Khonkarn et coll. présentent au cours d'une étude d'investigation sur les sources et les composés antioxydants que l'extrait à l'acétate d'éthyle de la pelure de peau de fruits du *Nephelium lappaceum* est riche en composés phénoliques notamment en acide gallique (2,3 mg/ml) et que ces composés phénoliques sont responsables de l'activité antioxydante. [96].

Les travaux de Thitilertdecha et coll. menés la même année (2010) ont permis d'isoler et d'identifier de trois composés phénoliques (acide ellagique, corilagine et le geraniine) à partir des extraits méthanoliques de la pelure du fruit, et d'évaluer l'activité antioxydante, jugée supérieure à celle du BHT [97].

IV- CONCLUSION

Les huiles essentielles et les lipides peuvent se retrouver au niveau des différents organes des plantes tels que les feuilles, tiges et graines. Les graines sont reconnues être des sites de bioaccumulation des lipides de réserve.

Les huiles essentielles tout comme les lipides de réserve sont formés d'un mélange de composés structuraux dont le point de départ de biosynthèse commun est l'acetyl CoA utilisés dans les cellules spécialisés pour la production des différents métabolismes cellulaires.

La production Africaine d'huiles essentielles et des lipides (huiles végétales) est très faible et les besoins sont compensés par d'importants volumes d'importation.

L'étude des plantes à huiles essentielles et à lipides de réserve n'est pas aussi exhaustive et il peut y avoir des espèces dont l'investigation n'est pas encore entreprise de façon simple ou séquencée.

Les données des travaux antérieures menées sur les plantes retenues pour ce projet rapportent que les deux espèces du genre *Aframomum* à savoir *Aframomum giganteum* et *Aframomum stipulatum* sont des plantes dont les organes produisent de l'huile essentielle, et que la grande partie des études menées sur le potentiel biologique des huiles extraites ne porte que sur celles des feuilles et rhizomes de ces plantes. Aucune donnée n'est rapportée sur la production des lipides à partir de ces espèces.

A notre connaissance, aucune étude n'a été encore menée sur la libération ou l'extraction directe ou séquencée des lipides de réserves de *Aframomum stipulatum* et *Aframomum giganteum*, connues comme plantes à huile essentielle ; C'est ainsi que nous nous proposons de mener des investigations sur la fraction lipidique des différentes parties du fruit de ces espèces.

Spondias mombin renferme des lipides de réserve au regard de la littérature; mais nous avons relevé très peu de données sur l'étude de la fraction lipidique des fruits de cette espèce. Bien que des composés volatils aient été présentés dans la littérature sur le fruit de *Spondias mombin*, nous n'avons pas retrouvé des informations sur une huile essentielle du fruit de cette espèce.

Les travaux antérieurs sur le *Nephelium lappaceum* montrent que la graine du fruit serait une source de lipides de réserve avec de fort taux en acide arachidique, d'où un intérêt particulier sera porté à ces amandes.

En somme, ces espèces du Congo sont peu étudiées. Dans le chapitre qui suit, une étude du potentiel chimique de ces espèces sera entreprise.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AFNOR, *Huile essentielle, recueil des normes françaises*. . AFNOR NF T 75-006. 1980, Paris: AFNOR.
2. Bruneton J., *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. Lavoisier ed. 1993, Paris: Tec & Doc. 915.
3. Tayoub G., Schowb I., Masotti V., Rabier J., Ruzzier M., Viano J., *Contribution de la microscopie électronique à balayage et photonique à la connaissance de l'anatomie et de la morphologie de *Styrax officinalis* L.* C. R. Biologies, 2006. **329**: p. 712-718.
4. Tedder J.M., *Basic Organic chemistry*. John Wiley & Sons ed. 1970, New York.
5. Bourrel C., *Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées*. 1993, Institut National Polytechnique de Toulouse: Toulouse - France.
6. De Billerbeck V.-G., *Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques*. Phytothérapie, 2007. **5**: p. 249-253.
7. Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T. & Arsenakis M., *Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils*. J. Agric. Food Chem., 1996. **44**: p. 1202 - 1205.
8. Knowles J.R., Roller S., Murray D.B, Naidu A.S., *Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(2): p. 797-803.
9. Tippayatum P., Chonhencob V., *Antibacterial Activities of Thymol, Eugenol and Nisin Against Some Food Spoilage Bacteria*. Kasetsart J. (Nat. Sci.), 2007. **41**: p. 319 - 323.
10. Zambonelli A., D'Aurelio A.Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L., Bianchi A., *Chemical composition and fungicidal activity of comercial oils of *thymus vulgaris* L.* J. Essent. Oil Res, 2004. **16**(1): p. 69 - 74.
11. Mangena T., Muyima N.Y.O., *Comparative evaluation of antimicrobial activities of essential oils of *artemisia afra*, *pteronia incana* and *rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains*. Lett. Appl. Microbiol., 1999. **28**(4): p. 291 - 296.
12. Saeedi K.A, Omidbaigi R., *Evaluation of content and composition of fatty acids, total phenolic and essential oil content of *Kelussia odoratissima* Mozaff. Seed*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2009. **25**(1): p. 113 - 119.

13. De Billerbeck V.-G., *Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques*. Phytothérapie 2007. **5**: p. 249-253.
14. Zakarya D., Tiyal F., Chastrette M., *Use of the multifunctional autocorrelation method to estimate molar volumes of alkanes and oxygenated compounds. Comparison between components of autocorrelation vectors and topological indices*. Journal of Physical Organic Chemistry, 1993. **6** (10): p. 574-582.
15. Chaumont J.P., Leger D., *Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisins. relation structure - activité*. Plant Med. Phyto, 1989. **23**(2): p. 124 - 126.
16. (USAID), A.A.p.l.D.I., *Stratégie nationale de développement du secteur des plantes aromatiques et médicinales au Maroc*. 2008, Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et à la lutte Contre la Désertification: Maroc. p. 70.
17. Sargent J.R., Bell M.V., Henderson R.J., Tocher D.R., *The lipids*. Fish nutrition, ed. H. J. 1989, New York: Academic. 153-218.
18. Wakeham, S.G., *Wax esters and triacylglycerols in sinking particulate matter in the Peru upwelling area (15° S, 75° W)*. Marine Chemistry, 1985. **17**(3): p. 213-235.
19. Merrien A., Morice J., Pouzet A., Morin O., Sultana C., *Graines oléagineuses des climats tempérés et leurs huiles*. A. Karleskind ed, ed. M.d.C. Gras. 1992, Paris: Tec&Doc 116-164.
20. Kapseu C., *Production, analyse et applications des huiles végétales en Afrique*. Oléagineux, Corps gras, Lipides, 2009. **16**(4): p. 215-29.
21. Ministere de l'Alimentation, d.l.A.e.d.l.P., *Rapport du groupe PNNS sur les lipides*. 2009.
22. CETIOM, *Monde - Huiles végétales - Production*. 2008.
23. Ohlrogge J., Browse J., *Lipid Biosynthesis*. The Plant Cell, 1995. **7**: p. 957-970.
24. Lamarti A., Bodoc A., Defieux G., Carde J.-P., *Biogénèse des monoterpenes*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1994. **133**: p. 79 - 99.
25. Ayerdi-Gotor A., *Étude des variations des teneurs et de la variabilité des compositions en tocophérols et en phytostérols dans les akènes et l'huile de tournesol (*Helianthus annuus L.*)*, in *Sciences des Agroressources*. 2008, Institut National Polytechnique de Toulouse: Toulouse. p. 196.
26. Nkounkou-Loumpangou C., Gouollaly T., Mahmout Y., Elouma Ndinga A.M., Ouamba J-M., Chalchat J.C., Figuéredo G., *Comparative study of the chemical composition of the essential oils from organs of *Annona senegalensis* Pers. oulotricha le Thomas subspecies (Annonaceae)*. African Journal of Biotechnology 2010a. **9**(6): p. 887-891.

27. Nkounkou-Loumpangou C., *Les plantes utilisées dans le traitement de l'infertilité féminine: Inventaire, phytochimie et évaluation biologique*, in *Valorisation des Plantes Aromatiques, Alimentaires et Médicinales*. 2010b, Université Marien NGOUABI: Brazzaville. p. 147.
28. Wélé A, Ndoye I., Badiane M, *Fatty acid and essential oil compositions of the seed oil of five Annona species*. Nigerian Journal of Natural Products and Medicine, 2004. **8**: p. 62-65
29. Laribi B., Kouki K., Mouguo A., Marzouk B., *Fatty acid and essential oil composition of three Tunisian caraway (*Carum carvi L.*) seed ecotypes*. J Sci Food Agric, 2010. **90**: p. 391-396.
30. Seidler-Lozykowska K., Baranska M., Baranski R., and Krol D., *Raman analysis of caraway (*Carum carvi L.*) single fruits: evaluation of essential oil content and its composition*. Journal Agricultural Food Chemistry, 2010. **58**(9): p. 5271-5275.
31. Fang R., Jiang C.H., Wang X.Y., Zhang H.M., Liu Z.L., Zhou L., Du S.S., and Deng Z.W., *Insecticidal activity of essential oil of *Carum carvi* fruits from China and its main components against two grain storage insects*. Molecules, 2010. **15**(12): p. 9391- 9402.
32. Sriti J., Talou T., Wannes W.A., Cerny M., Marzouk B., *Essential oil, fatty acid and sterol composition of Tunisian coriander fruit different parts*. J Sci Food Agric, 2009. **89**: p. 1659-1664.
33. Ramadan M.F., Mörsel J.T., *Oil composition of coriander (*Coriandrum sativum L.*) fruit-seeds*. European Food Research and Technology, 2002. **215**(3): p. 204-209.
34. Khorshidi J., Mirahmadi S.F., Tabatabaei M.F., *Oil content and yield of *Foeniculum vulgare* Mill. cv. Soroksary seeds as affected by different plant cultivation densities*. J Am Sci 2010. **6**: p. 1098-1100.
35. Barros L., Carvalho A.M., Ferreira I.C.F.R., *The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): shoots, leaves, stems and inflorescences*. Lebensmittel Wissenschaft Technologie, 2010. **43**: p. 814-818.
36. He W., Huang B., *A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare**. J. Med. Plant. Res., 2011. **5**(15): p. 3595-3600.
37. Bourgou Soumaya BI, Saidani M., and Marzouk B., *Fatty Acids, Essential Oil, And Phenolics Modifications of Black Cumin Fruit under NaCl Stress Conditions*. J Agric Food Chem., 2010. **58**: p. 12399-12406.
38. Wajs A., Bonikowski R., Kalemba D., *Composition of essential oil from seeds of *Nigella sativa L.* cultivated in Poland*. Flavour fragrance Journal, 2008. **23**(2): p. 126-132.

39. Cheikh-Rouhou S., Besbes S., Bentati B., Blecker C., Deroanne C., Attia H., *Nigella sativa L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction.* Food Chemistry, 2007. **101**: p. 673-681.
40. Tulukcu E., *A comparative study on fatty acid composition of black cumin obtained from different regions of Turkey, Iran and Syria.* African Agriculture Research Journal, 2011. **6**(4): p. 892-895.
41. Saeedi K.A., Omidbaigi R., *Chemical characteristics of the seed of iranian endemic plant Kelussia odoratissima.* Chemistry of Natural Compounds, 2010. **46**(5): p. 813-815.
42. Bouquet A., *Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo.* Brazzaville, in *Mémoire ORSTOM.* 1969, ORSTOM: Paris. p. 282.
43. Ouamba J.-M., *Valorisation chimique des plantes aromatiques du Congo. Extraction et analyse des huiles essentielles. Oximation des aldéhydes naturels.*, in *Sciences.* 1991, Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc: Montpellier. p. 341.
44. Wong K.C., Wong S.N., Loi H.K., Lim C.L., *Volatile Constituents from the Fruits of Four Edible Sapindaceae: Rambutan (*Nephelium lappaceum* Lo), Pulasan (*N. ramboutan-ake* (*Labill.*) Leenh.), Longan (*Dimocarpus longan* Lour.), and Mata Kucing (*D. longan* ssp. *malesianus* Leenh.).* Flavour and fragrance Journal 1996. **11**: p. 223-229.
45. Augustin M.A, Chua B.C., *Composition of Rambutan Seeds.* Pertanika, 1988. **11**(2): p. 211-215.
46. Bora P.S, Narian N., Holschuh Heinz J., Vasconcelos M.A.da S., *Changes in Physical and Chemical Composition during Maturation of Yellow Mombin (*Spondias mombin*) Fruits.* Food Chemistry, 1991. **41**: p. 341-348.
47. Humbert H., *Flore de Madagascar et Comores,* in *Museum National d'Histoire Naturelle.* 1946: Tananarive.
48. Kherharo J., Adam J.G., *La pharmacopée sénégalaise traditionnelle: Plantes médicinales et toxiques.* Vigot Frères ed. 1974, Paris.
49. Tane P., Tatsimo S.D., Ayimele G.A. and Connolly J.D., *Bioactive metabolites from Aframomum species.* in 11th NAPECA Symposium Book of Proceedings. 2005: Antananarivo, Madagascar. p. 214-223.
50. Adjanohoun E.J., Ahyi A.M.R., Ake A., *Médecine traditionnelle et pharmacopée: contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Congo.* 1988, ACCT: Paris p. 605.
51. Raponda-Walker A., Sillans R., *Les Plantes Utiles du Gabon.* Pail Lechevalier ed. 1961, Paris.

52. Cousins D., Huffman M.A., *Medicinal properties in the diet of gorillas: an ethnopharmacological evaluation*. African Study Monographs, 2002. **23**(2): p. 65-89.
53. De Bernadi M., Mellerio G., Paternoster-Colombo M., Vidari G., Vita-Finzi P., *Constyuenta of Essential Oil of Aframomum giganteum*. Journal Medicinal Plant research, 1981. **41**: p. 359-365.
54. Menut C., L.G., Amvan-zollo P.H., Atogho B.M., Abondo R., Bessiere J.M., Aromatic Plants of Tropical Central Africa V. Volatile components of three Zingiberaceae from Camerooun : Aframomum melegueta (Roscoe) K. Schum., A. daniellii (Hook f.) K. Schum. and A. Sulcatum (Oliv. and Hanb. K. Schum. Flavour and Fraqrance Jounal 1991. **6**: p.183-186.
55. Abondo R., Amvam Zollo P.H., *Valorisation des Plantes Aromatiques du Genre Aframomum du Cameroun*. Pharm. Méd. trad. afro, 1995: p. 81-88.
56. Neuwinger H.D., *African Ethnobotany: Poisons and Drugs*. . Chapman & Hall ed. 1996, London.
57. Agnaniet H., Menut C., Bessière J-M., *Aromatic plants of tropical central Africa. Part XLIX†: chemical composition of essential oils of the leaf and rhizome of Aframomum giganteum K. Schum from Gabon*. Flavour Fragrance Journal 2004. **19** p. 205-209.
58. Makumbelo E., Likoki L., paulus J.J.S.J., Luyindula N., *Stratégie de valorisation des espèces ressources des produits non ligneux de la savane des environs de kinshasa: II. Enquête ethnobotanique (aspects médicaux)*. Tropicultura, 2008. **26**(3): p. 129-134.
59. Abreu P.M., Norhona R.G., *volatile constituents of the Rhizomes of Aframomum alboviolaceum (ridley) K. Schum from Guinea-bissau*. Flavour and Fragrance Journal, 1997. **12**: p. 79-83.
60. Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totté J., Pieters L., Vlietinck A.J., *Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo*. Journal of Ethnopharmacology, 2002. **79**: p. 213-220.
61. Kpemissi-Amana E., *Les Anacardiaceae du Togo: Etudes botaniques, écologiques et propriétés antifongiques*, in *Scieneces pharmacautiques*. 2007, Université de Reims Champagne-Ardenne et Université de Lomé. p. 198.
62. Duvall C.S., *On the origin of the tree Spondias mombin in Africa*. Journal of Historical Geography, 2006. **32**: p. 249-266.
63. Hodouto K.K., *Etude chimique des plantes à flavonoïdes du Togo*. Bulletin de Médecine Traditionnelle de Pharmacopée, 1990. **1**(1): p. 31-48.

64. Trabi F.H., Irié G.M., N'Gaman K.C.C., Mohou C.H.B *Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d'Ivoire*. Sciences & Nature, 2008. **5**(1): p. 39 - 48.
65. Kpemissi-Amana E., *Les Anacardiaceae du Togo: études botaniques, écologiques et propriétés antifongiques*, in *Sciences pharmaceutiques*. 2007, Université de Reims Champagne-Ardenne et Université de Lomé: Togo. p. 198.
66. N'Zala D., Miankodila P., *Arbres et espaces verts à Brazzaville (Congo)*. Bois et Forêt des Tropiques, 2002. **272**(2): p. 88-92.
67. Arbonnier M., *Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest*. Pont-sur-Yonne ed. 2002, France: CIRAD/MNHN. 574.
68. Offiah V.N., Anyanwu I.I., *Abortifacient activity of an aqueous extract of Spondias mombin leaves*. Journal of Ethnopharmacology, 1989. **26**: p. 317-320.
69. Abo K.A., Ogunleye V.O., Ashidi J.S., *Antimicrobial Potential of Spondias mombin, Croton zambesicus and Zygotritonia crocea*. Phytother. Res., 1999. **13**: p. 494-497.
70. Hope G., *A literature survey of studies performed by master students at Département de Médecine Traditionnelle (DMT) in Bamako, Mali*. 2005, Farmasøytisk institutt. Universitetet i Oslo. p. 198.
71. Sangare D., *Etude de la prise en charge du paludisme par les thérapeutes traditionnelles dans les aires de Sante de kendie (Bandiagara) et de Finkolo ac (Sikasso)*. 2003, Faculté de Medicine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie. Bamako, Université du Mali: Mali, 106 p. p. 106.
72. Ayoka A.O., Akomolafe R.O., Iwalewa E.O., Akanmub M.A., Ukponmwani O.E. , *Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of Spondias mombin L. (Anacardiaceae) in mice and rats*. Journal of Ethnopharmacology 2006. **103**: p. 166-175.
73. Njoku P.C., Akumefula M.I., *Phytochemical and Nutrient Evaluation of Spondias Mombin Leaves*. Pakistan Journal of Nutrition, 2007. **6**(6): p. 613-615.
74. Igwe C.U., Onyeze G.O.C., Onwuliri V.A, Osuagwu C.G. and Ojiako A.O., *Evaluation of the Chemical Compositions of the Leaf of Spondias Mombin Linn from Nigeria*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2010. **4**(5): p. 706-710.
75. Bora P.S., Narian N., Holschuh H.J., Vasconcelos M.A.S., *Changes in Physical and Chemical Composition during Maturation of Yellow Mombin (Spondias mombin) Fruits*. Food Chemistry, 1991. **41** p. 341-348.
76. Eromosele C.O., Paschal N.H., *Characterization and viscosity parameters of seed oils from wild plants*. Bioresource Technology 2003. **86**: p. 203-205.

77. Ceva-Antunes P.M.N., Bisso H.R., Alves S.M., Antunes O.A.C., *Analysis of Volatile Compounds of Tapereba' (Spondias mombin L.) and Caja' (Spondias mombin L.) by Simultaneous Distillation and Extraction (SDE) and Solid Phase Microextraction (SPME)*. J. Agric. Food Chem., 2003. **51**: p. 1387-1392.
78. Narain N., Galvao M.S., Madruga M.S., *Volatile compounds captured through purge and trap technique in caja-umbu (Spondias sp.) fruits during maturation*. Food Chemistry, 2007. **102**: p. 726–731.
79. Adepoju O.T., *Proximate composition and micronutrient potentials of three locally available wild fruits in Nigeria*. African Journal of Agricultural Research, 2009. **4**(9): p. 887-892.
80. Aké C.B., Koné M.W., Kamanzi A.K., Aké M., *Evaluation de quelques propriétés biologiques de produits de cueillette non ligneux vendus sur les marchés d'Abidjan et environs*. Pharm. Méd. Trad. Afr., 2006. **XIV**: p. 1-17.
81. Tiburski J.H., Rosenthal A., Delizab R., Godoyb R.L.O, Pachecob S., *Nutritional Properties of Yellow Mombin (Spondias mombin L.) Pulp*. Food Research International, 2011(10.1016/j.foodres.2011.03.037).
82. Kapundu M., Blala G., Bliard C., Delaude C., *Contribution à l'étude chimique des sapindaceae. Examen de la Saponine de Pappea capensis*. bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 1991. **6**: p. 387-389.
83. Solis-Fuentes J.A., Camey-Ortiz G., Hernández-Medel M.D.R., Pérez-Mendoza F., Durán-de-Bazúa C., *Composition, phase behavior and thermal stability of natural edible fat from rambutan (Nephelium lappaceum L.) seed*. Bioresource Technology, 2010. **101**: p. 799–803.
84. Pohlan J., Vanderlinden E.J.M., Janssens M.J.J., *Harvest maturity, harvesting and field handling of rambutan*. international journal for reviews in postharvest biology and technology, 2008. **2**(11): p. 1-12.
85. Morton J., *Rambutan*. Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL., 1987: p. 262–265.
86. Abbey L., *Notes on importance and prospects of rambutan (Nephelium lappaceum L.): A lesser-known fruit crop in Ghana*. Ghana jnl agric. Sci., 2000. **33**: p. 95-98.
87. Augustin M.A., Chua B.C., *Composition of Rambutan Seeds*. Pertanika, 1988. **11**(2): p. 211-215.
88. Banerji R. CHOWDHURY, A.R., MISRA, G., NIGAM, S.K. (1984). Butter from 16 plants. Fette,Seifen, Anstrichmittel, 1984. **86**: p. 279-284.

89. Shukla V.K.S., et al. *Fat Sci Technol*, 1993. **95**: p. 567-569.
90. Aitzetmülle K., Ngoy-Kiyuya E., Kitwa-Kabila I., *Sumbi-Öl aus Nordost-Katanga und Süd-Kivu (Demokratische Republik Kongo)*. *Fett/Lipid* 1998. **100**(7): p. 308–312.
91. Ong P.K.C., Acree T.E., Lavin E.H., *Characterization of Volatiles in Rambutan Fruit (Nephelium lappaceum L.)*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1998. **46**: p. 611-615.
92. Okonogi S., Duangrat C., Anuchpreeda S., Tachakittirungrod S., Chowwanapoonpohn S., *Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels*. *Food Chemistry*, 2007. **103**: p. 839-846.
93. Winayanuwattikun P., Kaewpiboon C., Piriyanananon K., Tantong S., Thakernkarnkit W., Chulalaksananukul W., Yongvanich T., *Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand*. *Biomass and bioenergy*, 2008. **32**: p. 1279-1286.
94. Pohlan J., Vanderlinden E.J.M., Janssens M.J.J., *Harvest maturity, harvesting and field handling of rambutan*. Stewart Postharvest, 2008.
95. Thitilertdecha N., Teerawutgulrag A., Rakariyatham N., *Antioxidant and antibacterial activities of Nephelium lappaceum L. extracts*. Society of Food Science and Technology, 2008. **41**(10): p. 2029-2035.
96. Khonkarn R., Okonogi S., Ampasavate C., Anuchapreeda S., *Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines*. *Food and Chemical Toxicology* 2010. **48**(8-9): p. 2122-2129.
97. Thitilertdecha N., Teerawutgulrag A., Kilburn J.D., Rakariyatham N., *Identification of Major Phenolic Compounds from Nephelium lappaceum L. and Their Antioxidant Activities*. *Molecules*, 2010. **15**: p. 1453-1465.

CHAPITRE II : Etude phytochimique des fruits et graines saisonniers des quatre plantes à huiles essentielles et à lipides de réserve

I- INTRODUCTION

Le matériel végétal est constitué de diverses parties de fruits et graines des plantes à huile essentielles et à huile fixe.

L'extraction de ces agroressources a été conçue selon un schéma intégré de traitement des matières premières. Il est caractérisé par la séparation sélective des organes et la libération séquencée des constituants au moyen d'extraction solide/liquide ou liquide/liquide. Il s'en suit l'identification et la caractérisation des constituants majeurs et mineurs par des méthodes analytiques croisées non destructives et destructives. Des méthodes phytochimiques ont été employées pour la caractérisation des groupements chimiques fonctionnels dans la masse de la matrice végétale. Grâce à cette étude de composition chimique des organes des fruits et des graines saisonniers récoltés à Owando et à Boko, la classification de ces ressources végétales en plantes « Aroma-Tinco-Oleo-Crops Resources » est appropriée pour ces espèces qui montrent la bioaccumulation à la fois des huiles essentielles et des lipides de réserve.

Dans le chapitre IV, le synergisme ou l'antagonisme des effets chimiques et biologiques des huiles essentielles, des lipides de réserve des organes (peaux ou coques, pulpes, amandes) est étudié. Nous nous proposons d'explorer des relations directes ou indirectes entre les fonctionnalités/propriétés/activités biologiques des constituants de type huiles essentielles (huiles essentielles, lipides/lipides ou huiles essentielles/lipides des organes dans la masse de chaque matrice végétale ou en mélange de matrices végétales.

II- MATERIEL ET METHODES

II-1. Récolte

Les fruits des deux espèces de *Aframomum* à savoir : *Aframomum stipulatum* (Gagnep) K. Schum et *Aframomum giganteum* (Oliv&Hand) K. Schum, ainsi que ceux de *Spondias*

mombin L. et de *Nephelium lappaceum* L., ont été récoltés au sud du Congo-Brazzaville dans les localités autour de Boko. Une deuxième campagne de collecte a été organisée au Nord du Congo-Brazzaville dans la localité de Owando. Les récoltes sont faites manuellement : les fruits des *Aframomum* sont arrachés à la main au pied des tiges ; les grappes de fruits de *Spondias mombin* et de *Nephelium lappaceum* sont cueillies à l'aide d'une perche.

L'identification botanique de ces espèces a été réalisée par le Docteur Moutsamboté Jean Marie, enseignant-chercheur de botanique à l'Institut de Développement Rural de l'Université Marien Ngouabi. Des spécimens des espèces récoltées dans le cadre de cette étude ont été comparés à ceux déjà répertoriés dans l'herbier National du Congo :

- *Aframomum stipulatum* (Gagnep) K. Schum, spécimen de référence J. TROCHAIN (7985) ;
- *Aframomum giganteum* (Oliv&Hanb) K. Schum, spécimen de référence CH. DE NERE (1129) ;
- *Spondias mombin* L., spécimen de référence J. KOEHLIN (512).

Un spécimen de l'espèce *Nephelium lappaceum* L., non encore répertorié, est déposé dans l'herbier National du Congo, en cours d'enregistrement.

II-2. Séchage des plantes

Les fruits sont décortiqués manuellement. Les graines et les coques sont séchées au laboratoire UV2C de la faculté de Sciences de Brazzaville à l'aide d'un séchoir à l'abri de la lumière du soleil pendant 7 à 10 jours. La température dans le séchoir varie entre 40 et 60 °C. Le matériel végétal a été ensuite stocké dans des sacs en papier à l'abri de la lumière.

II-3. Détermination des grandes familles chimiques constitutives des végétaux

La méthode du screening par réactions en tubes, nous a permis d'identifier quelques grandes familles chimiques (les alcaloïdes, les polyphénols, les quinones, les stérols et triterpènes, ...) [1].

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation des composés des grandes familles chimiques présentes. Celle-ci est effectuée sur les broyats des végétaux secs et/ou frais [1, 2].

Le tableau II.1, indique les différents groupes chimiques recherchés et les réactifs spécifiques utilisés.

Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour mieux appréhender leur fonctionnalité chimique et activité phytochimique et biologique.

Tableau II. 1 : Réactifs utilisés dans la caractérisation des familles chimiques.

Familles chimiques	Réactifs	Composition du réactif	Résultats positifs
Alcaloïdes	Draragendorf	Nitrate de bismuth + acide acétique	précipité rouge orangé
	Mayer	iodure de potassium + chlorure de mercure	Précipité jaunâtre
Flavonoïdes	Shinoda	Ethanol 95 °+ HCl (N/2) + (Mg ou Zn)	coloration orangée, rouge ou violette
Stéroïdes et Terpénoïdes	Lieberman Bouchard	Anhydride acétique + d'acide sulfurique	coloration violette - bleue ou verte
Tannins	FeCl ₃ 1 %	FeCl ₃ 1 %	coloration bleu-foncé, verte ou noire
	Stiasny	HCl / Formol	
Polyphénols	Barton	FeCl ₃ 1 % + Fe (CN) ₆ (50%, v/v)	coloration bleu-noirâtre ou verte
Quinones	Bornstraëgen		coloration rouge ou violette
Anthocyanes	HCl 20%		coloration rose à froid, rouge-orangé à chaud
Saponosides	H ₂ O distillée		Indice Mousse (IM*) : test positif si IM>100

II-4. Procède d'extraction et caractérisation de la fraction huile essentielle

II-4.1.Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont obtenues à partir des différents organes de fruit de *Aframomum stipulatum* et de *Aframomum stipulatum* par hydrodistillation. L'appareil utilisé est un extracteur de type Clevenger (figure II.1) constitué d'un ballon de 6 litres contenant la matière végétale et l'eau distillée portés à ébullition pendant 6 heures, surmonté d'une colonne et d'un système de refroidissement capable de maintenir une distillation par

cohobation et de faciliter la récupération du distillat de la phase aqueuse par décantation.. Les conditions opératoires sont données dans le tableau II.2.

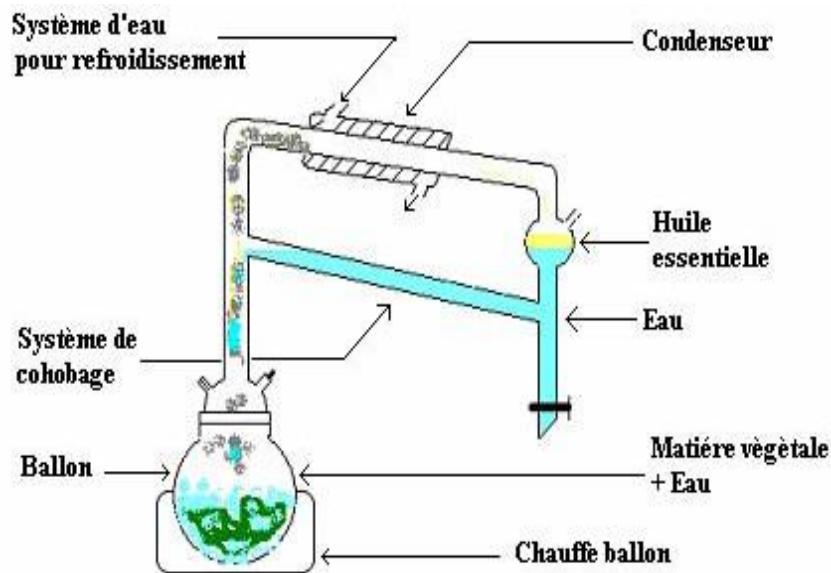


Figure II. 1: Appareillage type Clevenger utilisé pour l'hydrodistillation d'huile essentielle.

Tableau II. 2 : Conditions opératoires de l'hydrodistillation des différents organes de *Aframomum giganteum* et *Aframomum stipulatum*.

Matière végétale	A. stipulatum (origine Boko)		A. giganteum (origine Owando)	
	graines	coques	graines	coques
Quantité de matériel séché (g)	100	150	100	150
Quantité d'eau (L)	3,5	3,5	3,5	3,5
Temps d'extraction (h)	6	6	6	6

II-4.2. Analyses physico-chimiques par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Notre démarche analytique a consisté à optimiser les méthodes CPG à partir de références bibliographiques ou de normes AFNOR lorsqu'elles sont disponibles (*Carvi* norme AFNOR NF T 75-347). De nombreux essais ont été réalisés et ont finalement conduit aux méthodes d'analyses des huiles essentielles suivantes.

II-4.3. Analyses chimiques par Chromatographie en Phase Gazeuse munie d'un DéTECTEUR à Ionisation de Flamme (CPG/DIF)

Les chromatogrammes ont été réalisés grâce à un Chromatographe en Phase Gazeuse couplé à un DéTECTEUR à Ionisation de Flamme (CPG/DIF) Hewlett-Packard® 5890 série II muni d'un passeur automatique d'échantillons Agilent 6890. Le gaz vecteur est l'hélium. Le DIF fonctionne à l'air comprimé et l'hydrogène. Les gaz sont préalablement filtrés sur des cartouches Varian de charbon actif (élimination d'hydrocarbures), de filtration du gaz vecteur (élimination de l'eau de condensation et de l'oxygène). La colonne choisie est une colonne capillaire J&W Scientific (Agilent Technologies) de type DB-5 MS (nature phase stationnaire : polymère de phényl arylène, équivalent à (5%) phényl-méthyl polysiloxane), de dimensions 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Les conditions opératoires sont présentées dans le tableau II.3.

Tableau II. 3 : Conditions d'analyse CPG/DIF des huiles essentielles.

Paramètres	Valeurs
Température de l'injecteur	300 °C
Température du détecteur	300 °C
Température initiale du four	70 °C
Température finale du four	220 °C
Programmation de température du four	2°C/min
Quantité injectée	0,5 µl
Pression en tête de colonne	15 psi

II-4.4. Analyses chimiques par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

Nous avons également utilisé la chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectromètre de Masse. Les analyses CPG/SM ont permis d'acquérir les spectres de masse des différents composés constituant les huiles essentielles. Les identifications chimiques ont été réalisées sur la base de la comparaison de nos spectres de masse avec ceux de la banque de données Wiley275.

Le chromatographe est un Hewlett-Packard® 5890. Le gaz vecteur est l'hélium. Le détecteur à spectrométrie de masse est de type 5971A. La colonne choisie est une capillaire SGE de type BPx5 C (nature phase stationnaire : 5% phényl-polysilphénylenè siloxane), de dimensions 50 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Une micro-seringue de 1µL munie d'un répétiteur a été utilisée pour des injections manuelles. Le tableau II.4 présente les conditions analytiques utilisées.

Tableau II. 4 : Conditions d'analyse CPG/SM des huiles essentielles.

Paramètres	Valeurs
Température de l'injecteur	250 °C
Température du détecteur	250 °C
Température initiale du four	70 °C
Température finale du four	220 °C
Programmation de température du four	2°C/min
Quantité injectée	0,5 µl
Ratio split	1: 7

II-5. Procédé d'extraction et caractérisation de la fraction lipidique

II-5.1.Extraction des lipides

Deux méthodes ont été utilisées pour l'extraction d'huile. Tout d'abord, la méthode normalisée du Soxhlet NF EN ISO 659 (1998) a été mise en place. Cette méthode s'est avérée longue, fastidieuse et consommatrice de solvant. Au vu du nombre important d'échantillons à traiter au cours de ces travaux, une extraction automatique de l'huile (Accelerator Solvant Extractor) a été développée.

II-5.1.1. Méthode d'extraction à froid de l'huile

Les échantillons de matière végétale sont broyés avec un appareil (IKA Werke A11, Staufen, Allemagne) pour obtenir une poudre fine et homogène. 2 g de poudre sont introduits dans un

tube en téflon de 30 mL préalablement taré. L'huile est extraite avec 20 mL d'un mélange isohexane/isopropanol (qualité HPLC, SDS, France) (3 :2 v/v).

Le mélange du broyat dans le solvant est dispersé avec un ultra-turax IKA T25, 3 à 5 minutes, puis centrifugé 15 minutes à 10000 g (20°C). Le surnageant est prélevé et un deuxième cycle d'extraction est effectué. Les fractions sont regroupées, séchées sur du Na₂SO₄ anhydre, filtrées et le solvant est évaporé sous un flux d'azote (Air liquide, France) dans un ballon, jusqu'à obtenir une goutte d'huile. Le tube est pesé pour obtenir par différence la quantité d'huile récupérée exprimée en grammes.

II-5.1.2. Méthode de référence (Soxhlet)

Le protocole d'extraction suivi est la méthode normalisée du Soxhlet décrite par AFNOR NF EN ISO 659 (1998). 15,0 g de poudre de chaque échantillon sont extraites au cyclohexane pendant 6 h, pour extraire la totalité de l'huile. Après évaporation du solvant sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (40 - 60 °C), les extraits de chaque partie du fruit sont séchés puis pesés.

II-5.1.3. Méthode par extraction automatique (ASE)

La méthode par ASE (Accelerated Solvent Extractor) repose sur le même principe que la méthode du Soxhlet. Cette technique d'extraction par solvant fonctionne à des températures et des pressions élevées afin d'accroître l'efficacité de l'extraction. Cette technique présente des avantages : courte durée d'extraction, économie en solvant et modulation des paramètres d'extraction.

La comparaison des différentes techniques d'extraction ainsi que les paramètres déterminant les conditions d'extraction et le nombre de cycles ont été définis par Bruhl & Matthaus (1999). Les conditions opératoires utilisées sont présentées dans le tableau II.5. Afin de déterminer les paramètres optimaux d'extraction ASE (Accelerated Solvent Extractor 200 Dionex, Toulouse France), nous avons porté le nombre de cycle d'extraction à 4.

Tableau II. 5 : Conditions d'extraction des huiles (lipides) par ASE (200 DIONEX).

Paramètres	Valeurs
Température	105 °C
Pression	100 Bar
Statique	10 min
Cycle	4
Flush	100 %
Purge	100 sec
Solvant	Cyclohexane

II-5.2. Caractérisation de la fraction lipidique :

II-5.2.1. Saponification et obtention des acides gras (A.G.)

La saponification de 0,5 g des extraits obtenus par le soxhlet est réalisée avec 25 mL d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 2N, portés à reflux pendant 1h 30. Après refroidissement, on ajoute 50 mL d'eau. Les matières insaponifiables sont extraites trois fois avec 50 mL d'hexane. La solution savonneuse est acidifiée jusqu'à précipitation des acides gras (pH = 5-6). Les acides gras libérés sont alors extraits trois fois avec 50 mL d'éther diéthylique (AFNOR, NFT 60-205).

Les acides gras sont transformés en esters méthyliques par addition d'une solution méthanolique de TMSH (triméthyl hydroxyde de sulfonium 0,5 M dans le méthanol). Les esters méthyliques obtenus sont analysés par CPG [5].

II-5.2.2. Analyse des acides gras par Chromatographie en Phase Gazeuse munie d'un DéTECTeur à Ionisation de Flamme (CPG/DIF)

Une fraction de près 20 mg de l'huile obtenue précédemment est prélevée et introduite dans un vial. On ajoute à cette fraction 1mL de TBME (tertio-butyl methylEther); après agitation et filtration avec un filtre 0,45 µm, un aliquot de 100 µl de la solution filtrée est introduit dans un insert et on rajoute 50 µl de TMSH (triméthyl hydroxyde de sulfonium 0,5 M dans le méthanol). La solution obtenue est analysée en chromatographie phase gazeuse couplée à un

détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID). Nous avons utilisés un chromatographe de type Perkin Elmer équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) avec les conditions opératoires présentées dans le tableau II.6.

Tableau II. 6 : Conditions d'analyse des acides gras en CGP-FID.

Paramètres	Valeurs
Type de colonne	colonne capillaire CP – select CB for FAME fused Silica WCOT (50 m x 0,25 mm x 0,25µm)
Gaz vecteur	Hélium : 1mL/min
Température de l'injecteur	250 °C
Quantité injectée	1,0 µl
Température de l'injecteur	250 °C
Programmation température du four	185°C (40min) ; 15°C/min jusqu'à 250 °C ; 250 °C (10,68 min)
Température du détecteur FID	250 °C
Injecteur mode split	1/100
Durée d'analyse	55 min

Les acides gras sont identifiés par comparaison des temps de rétention avec ceux d'un mélange des acides gras de référence (mixt 37).

II-5.3.Dosage des stérols.

Des prises d'essai d'environ 250 mg de broyat de graines, coques et pulpes de fruits ont été saponifiées avec 2 mL d'une solution de KOH alcoolique (éthanol) à 1M dans des tubes à vis préalablement traité avec une solution étalon chloroformique de cholestanol (2mg/mL) (50 µL de la solution étalon sont pesés dans les tubes, puis le solvant est évaporé à sec sous une hotte, afin de déterminer la quantité d'étalon utilisé pour le dosage), le milieu saponifié est soumis à une agitation par vortex ; puis chauffé au bain marie à 75°C pendant 60 min (30 min après le début du chauffage, les tubes sont retirés du bain pour une agitation, puis remis dans le bain).

Les milieux sont refroidis et on ajoute 1 mL d'eau distillée suivi d'une agitation vortex et la fraction non saponifiée est extraite avec ajout de 6 mL d'isohexane. Après agitation et

décantation, la phase de l'isohexane est prélevée, filtrée. A 160 µl de l'extrait filtré sont ajoutés 40 µl de réactif de silylation (1 mL de MSHFBA + 50 µL de méthyl imidazole). Le mélange est chauffé environ 2 minutes à l'étuve à 103° C avant analyse par CPG. L'identification des stérols a été réalisée par comparaison de leurs temps de rétention avec celui du cholestanol sur la colonne CPsil 8 CB.

II-5.3.1. Analyse des phytostérols par Chromatographie en Phase Gazeuse munie d'un DéTECTeur à Ionisation de Flamme (CPG/DIF)

La détermination de la teneur en phytostérols a été réalisée selon la norme ISO 12228 :1999 (EC, 1995; 1999) sur l'huile extraite. Le principe de l'analyse des phytostérols est basé sur l'isolement de la fraction insaponifiable puis une silyllation de cette fraction avant injection directe en chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les différents phytostérols ont été quantifiés par une calibration interne à l'aide de cholestanol. Chaque échantillon a été extrait 2 fois et dosé 2 fois. Le protocole d'extraction des phytostérols est décrit en détail dans le paragraphe précédent. Les teneurs en phytostérols sont exprimées en mg par 100 g d'huile (mg.100 g⁻¹ huile) ou en mg par 100 g de matière sèche (mg.100 g⁻¹ MS).

Les conditions opératoires présentées dans le tableau II.7 ont été appliquées à un chromatographe de type Perkin Elmer équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID).

Tableau II. 7 : Conditions d'analyse des stérols en CGP-FID.

Paramètres	Valeurs
Type de colonne gaz vecteur	colonne capillaire CPsil 8CB : 30 m x 0,25 mm x 0,25µm Hélium : 1mL/min
Température de l'injecteur	340 °C
Quantité injectée	1,0 µl
Programmation température de l'injecteur	55 °C (0,5min); 200 °C/min jusqu'à 340 °C et 340 °C (30 min)
Programmation température du four	160°C (0,5min); 20°C/min jusqu'à 260 °C (5,5min); 2°C/min jusqu'à 300°C (10min) ; 45 °C/min jusqu'à 350 °C (3 min)
Température du détecteur	365 °C
Injecteur mode split	1/10

II-5.4.Dosage des tocophérols

La détermination de la teneur en tocophérols des huiles brutes a été réalisée selon la norme ISO 9936 (1997). L'extraction de tocophérols s'est fait sur l'extrait lipidique obtenu selon le procédé d'extraction à froid. La séparation complète des quatre formes de tocophérol a été obtenue par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Chaque échantillon a été dosé deux fois. Le protocole d'analyse des tocophérols et les conditions opératoires sont présentées dans le tableau II.8. Les teneurs en tocophérols sont exprimées en mg par kg d'huile ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ huile).

Tableau II. 8 : Conditions d'analyse des tocophérols en HPLC.

Paramètres	Valeurs
Type de colonne	colonne : Kromasil 100 SIL 5 μ (250 x 4 mm)
Quantité injectée	1,0 μl
Solvant d'élution	Isooctane/isopropanol (99,5 :0,5 v/v)
Débit	1 mL/min
Détecteur fluorimètre	$\lambda_{\text{ex.}}$ (exitation) 290 nm ; $\lambda_{\text{em.}}$ (émission) 330 nm

II-5.4.1. Analyse quantitative des tocophérols par Calibration externe

Les quatre formes de tocophérols ont été identifiées et quantifiées par une calibration externe à l'aide des standards de tocophérols. Les solutions mères de 0,1 mg/mL ont été préparées puis quantifiés par spectrométrie UV-Visible à 292 nm pour l' α -tocophérol, à 296 nm pour le β -tocophérol et à 298 nm pour le γ - et δ -tocophérol. Des solutions filles de 5 ; 10 ; 20 ; 30 et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sont préparées à partir des solutions mères et injectées individuellement en HPLC.

II-6. Répétabilité des analyses

La répétabilité des analyses et l'erreur analytique commise sur l'extraction d'huile, les teneurs en tocophérols par HPLC et les teneurs en phytostérols par CPG ont été déterminées au moins par trois (3) essais pour les lots d'échantillons de chaque année.

Chaque lot d'échantillon a été caractérisé par sa teneur en lipide, en acides gras, ses teneurs en tocophérols et en phytostérols ; la teneur en huile essentielle et ces constituants ont également été déterminés.

En résumé de cette partie, tous les échantillons collectés ont fait l'objet du schéma d'analyses présenté sur la figure II.3.

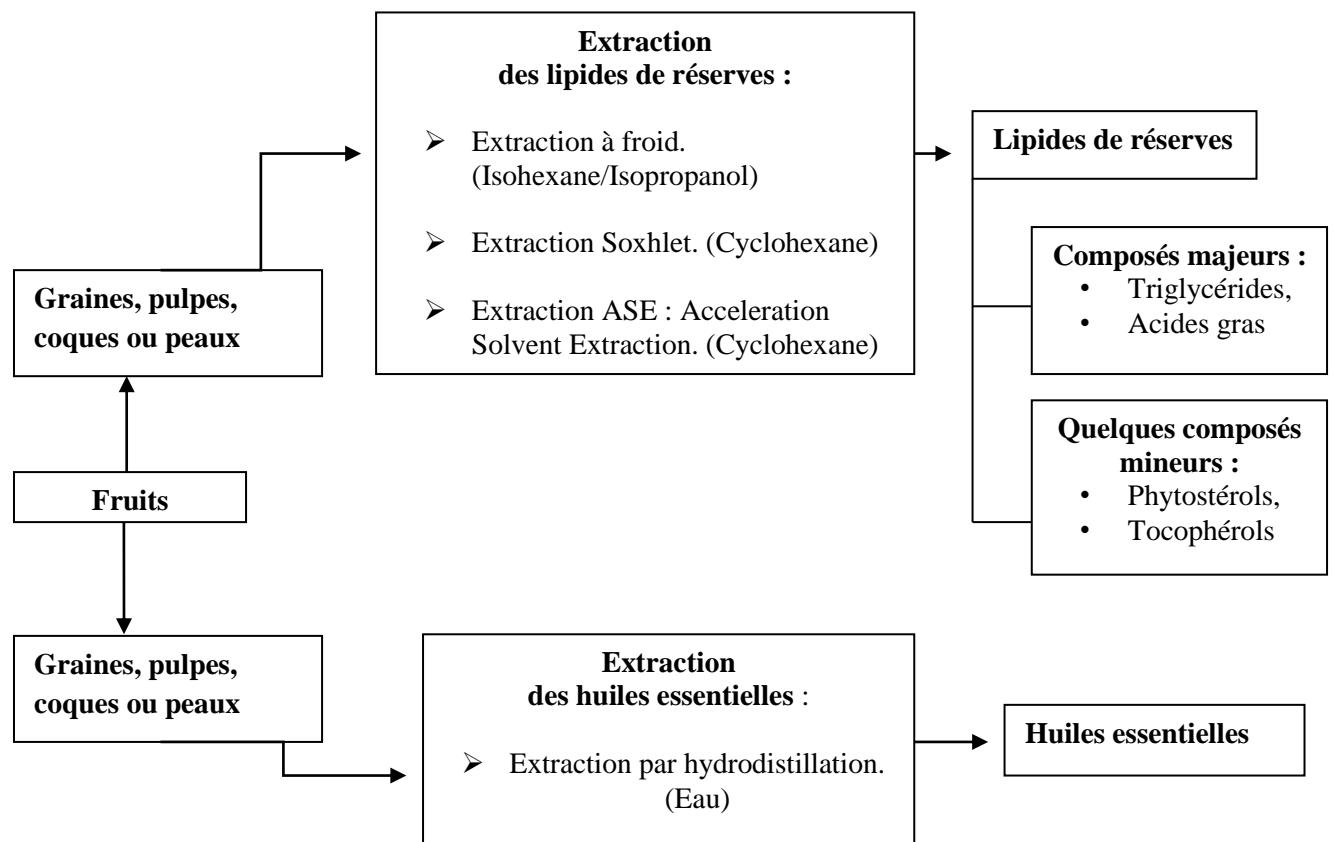


Figure II. 2 : Schéma des différentes étapes de traitement des différentes parties des fruits.

III- RESULTATS ET DISCUSSIONS

III-1. Analyse phytochimique des graines et coques des fruits de *Aframomum giganteum* (K. Schum) et de *Aframomum stipulatum* (K. Schum)

Les résultats du screening chimique réalisé sur les graines et les coques de fruits de *Aframomum giganteum* (origine: owando); *Aframomum stipulatum* (origine : Boko) ont été rassemblés dans le tableau II.9.

Le criblage phytochimique réalisé par la méthode de réaction colorée a révélé la présence des composés terpénoïdes et stéroïdes, saponosides et tanins dans les graines et coques de ces *Aframomum*, tandis que les flavonoïdes et quinones libres n'ont pu être détectés que dans les coques de fruits.

Tableau II.9 : Profil phytochimique des extraits de *Aframomum giganteum* (origine : Owando) et de *Aframomum stipulatum* (origine : Boko)

Familles phytochimiques	<i>Aframomum giganteum</i> (Oliv.&Hanb)K. Schum Origine : Owando		<i>Aframomum stipulatum</i> (Gagnep)K. Schum Origine : Boko	
	graines	coques	graines	coques
Saponosides	++	+	++	+
Flavonoïdes	-	+	-	+
Alcaloïdes	-	-	-	-
Tanins	+	++	+	++
Stérols et terpenoïdes	++	+	+	+
Quinones libres	-	+	-	+
Leuco anthocyanes	-	-	-	-
Anthraquinones	-	-	-	-

(++) = Abondance, (+) = Présence, (-) = Absence.

Les alcaloïdes, les anthocyanes et les leucocyanes sont absents dans les différents extraits testés de graines et coques de fruits de *Aframomum stipulatum* (Gagnep) K. Schum et de *Aframomum giganteum* (Oliv&Hand) K. Schum.

III-2. Observation au microscope des graines de fruits de *Aframomum stipulatum* (Gagnep) K. Schum et de *Aframomum giganteum* (Oliv.&Hand) K. Schum

L'observation microscopique de la graine des *Aframomum* révèle qu'il s'agit d'une plante dicotylédone. Les cellules présentent une double paroi cellulaire constituée de cellulose, d'hémicellulose, de lignine et de pectine. A l'intérieur des cellules de la graine se trouvent deux types d'organelles qui contiennent l'essentiel des réserves en huile et protéines de la graine.

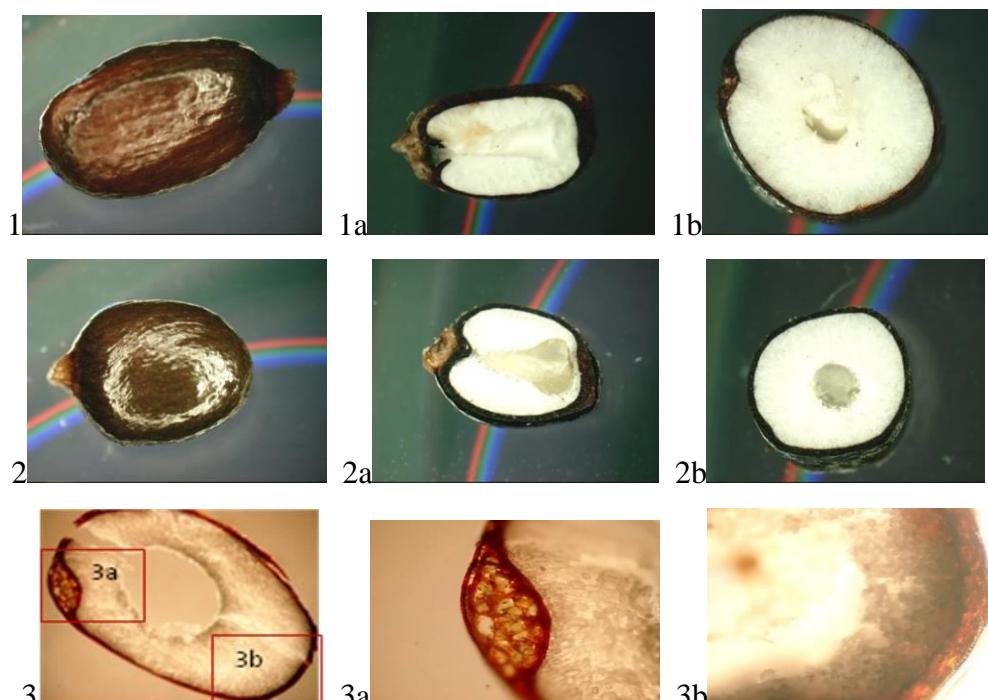


Figure II.3 : Images obtenues à la loupe et au microscope optique des graines de *Aframomum stipulatum* et *Aframomum giganteum* (K. Schum).

1: graine de *A. stipulatum*; 1a: coupe longitudinale de graine de *A. stipulatum*; 1b: coupe transversale de graine de *A. stipulatum*; 2: graine de *A. giganteum*; 2a: coupe longitudinale de graine de *A. giganteum*; 2b: coupe transversale de graine de *A. giganteum*; 3 : coupe transversale de *Aframomum giganteum* au microscope ; 3a et 3b : grossissement de certaine zone du tégument.

Des observations à la loupe optique réalisées sur les graines de *Aframomum stipulatum* (Gagnep) K. Schum (figure I.1.1) et *Aframomum giganteum* (Oliv. & Hand) K. Schum (figure I.1.2), nous ont permis de relever les différences structurales entre les graines. En effet, elles présentent toutes les deux une forme ovoïde ; mais la graine de *Aframomum giganteum* est plus arrondie que celle de *Aframomum stipulatum* qui est plus allongée. La différence sur

l'épaisseur des téguments a aussi été notée (figure 1a, b et 2a, b). Le tégument de la graine de *Aframomum giganteum* est plus épais que celui des graines de *Aframomum stipulatum*. Nous avons aussi observé que ces téguments se présentent sous forme de trois feuillets (figure I.1 3, 3a et 3b) avec des structures cellulaires et une histologie spécialisée différente de celles observées dans l'albumen. Ces observations nous ont conduits à penser que les cellules à huile essentielle se trouvent dans ces téguments, lieu de bioaccumulation des huiles essentielles. Quant aux lipides de réserve, ils sont localisés dans l'albumen. Ceci est mis en évidence après coloration de l'albumen en rouge par le rouge Soudan III.

III-3. Etudes qualitative et quantitative des huiles essentielles de *Aframomum stipulatum* K. Schum et de *Aframomum giganteum* K. Schum

Le tableau II.10 rassemble les rendements d'extraction des huiles essentielles de *Aframomum stipulatum* et *Aframomum giganteum* et quelques caractéristiques physiques sont significativement différents entre ceux des graines et des coques de ces deux *Aframomum*. Ces résultats sur les teneurs en huiles essentielles des graines sont en accord avec les travaux de Ouamba [6] ; Les graines de *Aframomum giganteum* ont un rendement moyen de 1,85% tandis que les graines de *Aframomum stipulatum* nous donnent des rendements autour de 0,2 %. Cependant les teneurs en huiles essentielles des coques de fruits sont de l'ordre de 0,3 % pour *Aframomum giganteum*, bien supérieures à celles de *Aframomum stipulatum*, qui est environ égale à 0,2 %.

Nous n'avons pas retrouvés dans la littérature des informations sur les huiles essentielles extraites des coques de fruits de ces deux espèces.

Tableau II.10 : Rendement et constantes physicochimiques des huiles essentielles extraites de différentes parties de fruits de *Aframomum stipulatum* K. Schum et de *Aframomum giganteum* K. Schum.

Espèces	Organe	Rendement (%)	Couleur	n_D^{20}
<i>Aframomum stipulatum</i>	Graine	0,25	Jaune claire	1,4832
	Coques	0,26	jaune	1,4755
<i>Aframomum giganteum</i>	Graine	1,85	Jaune	1,4370
	Coques	0,32	Jaune foncé	1,3456

Les compositions relatives des huiles essentielles de graines et coques de fruits de *Aframomum stipulatum* et de *Aframomum giganteum* sont présentées dans le tableau II.11.

Tableau II.11 : Composition en huile essentielle (% m/m) de différentes parties du fruit de *Aframomum stipulatum* K. Schum et de *Aframomum giganteum* K. Schum.

Composés	RI ^a	RI ^b	<i>Aframomum stipulatum</i> Graine(36*)	<i>Aframomum stipulatum</i> Coque (31*)	<i>Aframomum giganteum</i> Graine(26*)	<i>Aframomum giganteum</i> Coque(33*)
n-Heptan-2-ol	904	-	-	-	-	12.2 ± 0.2
α-Thujene	928	1027	-	3.6 ± 0.1	-	2.3 ± 0.3
α-Pinene	936	1032	46.9 ± 1.0	30.4 ± 1.1	57.8 ± 1.5	52.3 ± 0.8
Campheine	947	1075	-	-	-	4.1 ± 0.3
Sabinene	975	1124	7.3 ± 0.2	19.2 ± 0.1	3.5 ± 0.2	14.7 ± 0.3
β-Pinene	982	1118	428.2 ± 1.8	235.2 ± 1.7	340.0 ± 1.1	143.4 ± 0.7
Myrcene	991	1161	2.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	2.9 ± 0.1	9.8 ± 0.2
α-Phellandrene	1003	1176	-	-	-	5.3 ± 0.1
p-Cymene	1027	1027	12.9 ± 0.2	49.2 ± 0.1	12.8 ± 0.4	15.6 ± 0.3
β-Phellandrene	1031	1218	-	-	7.2 ± 0.2	60.6 ± 0.8
Limonene	1032	1203	15.4 ± 0.5	33.5 ± 0.6	50.8 ± 0.9	71.1 ± 0.1
1.8-Cineol (eucalyptol)	1035	1213	35.3 ± 0.1	143.6 ± 0.2	170.2 ± 0.8	204.5 ± 1.6
Heptyl acetate	1044	-	-	-	-	2.8 ± 0.1
E-β-Ocimene	1049	1052	1.7 ± 0.1	-	-	-
γ-Terpinene	1060	1266	-	12.6 ± 0.2	4.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1
Cis-Sabinene hydrate	1068	1458	-	-	-	3.2 ± 0.2
Terpinolene	1088	1290	-	5.8 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.2
Nonanone-2	1091	1355	-	-	-	2.8 ± 0.1
Linalool	1101	1548	2.2 ± 0.1	13.3 ± 0.2	-	188.9 ± 0.1
α-Fenchol	1117	-	-	3.4 ± 0.1	-	-
Menth-2-en-1-ol (cis -para)	1121	1638	-	4.2 ± 0.1	-	-
Sabinol cis / pinocarveol trans	1145	1606	4.9 ± 0.1	11.8 ± 0.8	3.0 ± 0.1	-
Camphor	1144	1532	-	-	3.7 ± 0.1	14.4 ± 0.8
Borneol	1166	1719	-	4.0 ± 0.3	-	5.1 ± 0.
Pinocamphone cis	1180	1566	5.5 ± 0.1	-	-	5.9 ± 0.1
Terpinen-4-ol	1182	1611	-	151.6 ± 2.1	3.4 ± 0.1	9.4 ± 0.2
Cryptone	1190	1690	-	-	-	4.9 ± 0.1
α-Terpineol	1196	1705	-	122.1 ± 1.44	43.3 ± 0.5	-
Myrtenol	1199	1804	16.6 ± 0.4	-	-	-
Myrtenal	1196	1641	-	-	-	97.6 ± 2.1
Ambersage	1266	-	-	5.3 ± 0.5	-	-
Acetate de bornyle	1289	1552	-	-	-	2.9 ± 0.1
Myrtenyl acetate	1312	1698	-	6.6 ± 0.2	-	9.6 ± 0.1
α-Terpenyl acetate	1389	1709	-	3.7 ± 0.1	-	-
β-Elemene	1392	1600	5.9 ± 0.1	-	4.9 ± 0.1	-
Cyperene	1408	-	20.9 ± 1.2	3.7 ± 0.1	2.6 ± 0.1	5.1 ± 0.2
β-Caryophyllene	1426	1421	91.7 ± 1.4	4.8 ± 0.1	7.0 ± 0.2	12.0 ± 0.4
α-Guaiene	1439	-	1.6 ± 0.1	-	-	-
AlloAromadendrene	1450	1661	-	-	11.3 ± 0.2	-
Aromadendrene	1451	1628	1.7 ± 0.1	-	-	-
α-Humulene	1462	1687	77.4 ± 1.4	-	-	-

β -Selinene	1489	1715	12.5 ± 0.3	-	4.6 ± 0.1	-
α -Selinene	1494	1744	2.8 ± 0.2	-	230.0 ± 5.1	-
Valencene	1497	1740	2.5 ± 0.1	-	15.4 ± 1.1	-
(Z)- α -Bisabolene	1502	1746	4.0 ± 0.1	-	-	-
β -Bisabolene	1510	1741	1.1 ± 0.1	-	-	-
γ -Cadinene	1522	1776	1.9 ± 0.1	-	-	-
7-Epi- α -Selinene	1525	1740	7.9 ± 0.2	-	5.4 ± 0.1	-
Elemol	1550	2082	-	-	-	2.6 ± 0.1
(E)-Nerolidol	1564	2050	-	-	-	9.2 ± 0.3
(+) spathulenol	1582	2110	3.8 ± 0.1	-	-	-
Cayophyllene oxyde	1588	1974	43.7 ± 1.3	34.3 ± 1.1	2.5 ± 0.1	11.1 ± 0.1
Guaiol	1600	2103	2.0 ± 0.1	-	-	-
1,2 Epoxy Humulene	1616	2210	26.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1	-	-
Alloaromadendrene	1638	-	4.2 ± 0.1	-	-	-
Caryophylla-14(12),8(13)-diene-5- β -ol	1641	2299	-	6.9 ± 0.1	-	-
β -Eudesmol	1651	2217	-	-	3.1 ± 0.1	-
Intermedeol (neo)	1660	-	23.0 ± 1.1	4.2 ± 0.1	2.9 ± 0.1	-
α -Cadinol	1663	2255	-	12.4 ± 1.3	-	-
Intermedeol	1667	-	-	5.1 ± 0.2	4.6 ± 0.1	4.4 ± 0.1
(Z)- α -Santalol	1675	-	1.7 ± 0.1	-	-	-
Eudesma-4(15)-en-one	1682	-	-	8.5 ± 0.13	-	-
α -Bisabolol	1683	2222	-	-	-	6.9 ± 0.2
β -Acoradienol	1754	-	1.5 ± 0.1	-	-	-
Ambrial	1807	-	8.7 ± 0.1	-	-	-
Tricosane	2300	2300	-	10.0 ± 0.3	-	-
NI	2357	-	44.4 ± 0.3	-	-	-
Kauren-16-18-oic acid, 6 hydroxy-7-oxo	2459	-	6.6 ± 0.1	-	-	-
Pentacosane	2500	2500	-	4.4 ± 0.1	-	-
Total de composés identifiés (g kg ⁻¹)			977.7 ± 7.8	960.6 ± 4.2	1000 ± 3.1	999.9 ± 4.1
<i>Familles chimiques(g kg⁻¹)</i>						
Monoterpènes hydrocarbonés			514.8 ± 6.5	392.8 ± 3.2	482.2 ± 8.1	387.8 ± 3.6
Monoterpènes oxygenés			64.4 ± 2.6	469.5 ± 5.5	223.5 ± 2.2	560.7 ± 6.5
Sequiterpènes hydrocarbonés			231.8 ± 4.3	8.6 ± 1.1	281.0 ± 3.5	17.2 ± 2.2
Disequiterpènes oxygenés			106.8 ± 1.8	66.7 ± 1.5	13.2 ± 5.3	34.2 ± 1.1
Sequiterpènes oxygenés			8.7 ± 1.0	14.4 ± 1.0	-	-
<i>Classes chimiques(g kg⁻¹)</i>						
Alcools			55.7 ± 1.6	349.0 ± 6.1	60.3 ± 2.5	238.8 ± 7.5
Cétones			-	-	3.70 ± 0.2	22.1 ± 1.3
Aldehydes			-	-	-	97.6 ± 4.8
Esters			-	15.6 ± 2.1	-	15.2 ± 2.5
époxydes			110.1 ± 5.0	181.7 ± 6.2	172.8 ± 5.5	215.6 ± 6.5
RI ^a , RI ^b : indice de rétention calculé respectivement sur une colonne apolaire (HP-5) et une colonne polaire (HPInnowax); proportion de composés volatils calculés à partir de chromatogramme sur une colonne HPInnowax. (*) Nombre de composés identifiés. NI: non identifié.						

Près de 69 composés ont été identifiés pour l'ensemble des huiles analysées. L'huile de graines de *A. stipulatum* contient 36 composés. Le β -pinène (42,82 %) et β -caryophyllène (9,17 %) sont les composés majoritaires. Cette huile est riche en hydrocarbures monoterpéniques (51,48 %) et en sesquiterpéniques (23,18 %). Les alcools (5,6 %) et les époxydes (10,1 %) sont les seuls composés oxygénés présent dans cette huile essentielle.

L'huile essentielle des graines de *Aframomum giganteum* est constitué de 26 composés ; les composés majoritaires sont le β -pinène (34 %), α -selinène (23 %) et le 1,8-cinéol (17 %). Les hydrocarbures monoterpéniques représentent 48,22 % de la composition et leurs homologues oxygénés 22,35 %. Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont à 28,10 %.

L'huile de coques de *Aframomum stipulatum* est constitué majoritairement de β -pinène (34 %), de terpinéol-4 (15,16 %), de 1,8-cinéol (14,32 %) et de α -terpineol (12,21%). Les monoterpènes oxygénés sont prédominants (46,95 %) suivi de leurs homologues hydrocarbonés (38,76 %) ;

Dans l'huile essentielle de coques de *Aframomum giganteum*, on a une riche en composés monoterpènes oxygénés (56%) et en monoterpènes hydrocarbonés (38,78 %). Les composés majpritaires sont : le 1,8-cineol (20,45 %), linalol (18,89 %) et β -pinène (14,34 %). nous avons identifié 33 composés.

Cependant quelques différences ont été observées avec les compositions présentées par Ouamba en 1991 sur la graine de *Aframomum giganteum* (K. Schum). Notre échantillon provenant de la localité de Owando présente une teneur en α -selinène (23 %) supérieure par rapport aux données de Ouamba (3,5 %). La graine de *Aframomum stipulatum* (K.Schum) a une teneur de 3,5 % en 1,8-cineol alors que l'étude de Ouamba identifie ce composé à des taux plus élevés (9,5-13,4 %) [6].

III-4. Etudes de la fraction lipidique des graines et coques de fruits de *Aframomum stipulatum* (gagnep) K. Schum et de *Aframomum giganteum* (Oliv&Hanb) K. Schum

III-4.1. Rendements d'extraction des huiles de réserve de *Aframomum giganteum* et *Aframomum stipulatum*

Les graines des deux espèces de *Aframomum* montre une teneur modérée en lipides, allant de 8 à 10 % pour *Aframomum stipulatum* et de 16 à 21 % pour *Aframomum giganteum*. Ces teneurs sont intéressants pour la valorisation de *Aframomum giganteum*. Les coques de ces

fruits ont montré des teneurs en extrait lipidique faibles : 1 à 2% pour la coque de *Aframomum stipulatum* et 2 à 3 % pour celle de *Aframomum giganteum*. La figure II.4 montre les différents taux d'extraction à ASE et au Soxhlet.

Les méthodes d'extraction à froid et celle de Bligh & Dyer, ont donné de faibles teneurs en huile environ 5 % pour la graine de *Aframomum stipulatum* et 13 % pour la graine de *Aframomum giganteum*.

On constate que les teneurs en lipides sont améliorées par la technologie d'extraction ASE.

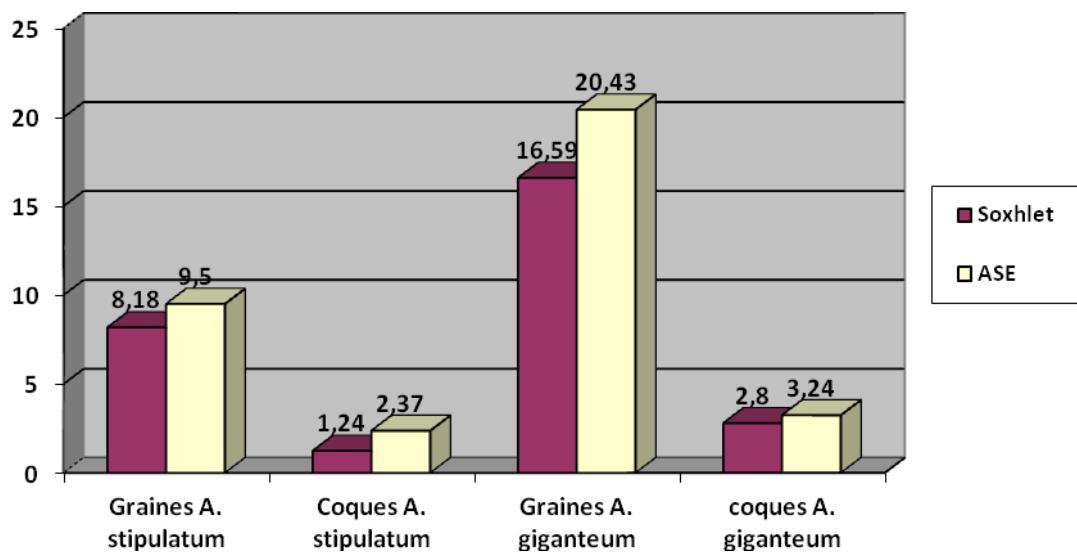


Figure II.4 : Rendement en huile végétale extrait des graines et coques de fruits de *Aframomum stipulatum* (gagnep) K. Schum et de *Aframomum giganteum* (Oliv. & Hanb.) K. Schum

En plus de la rapidité de la rapidité de sa mise en œuvre, la méthode d'extraction ASE a été retenue pour la suite des travaux d'extraction des lipides de réserve des organes des deux *Aframomum*. Les lipides obtenus ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse afin de déterminer leur composition en acides gras. Les phytostérols et tocophérols ont été de préférence déterminés à partir des fractions de l'extraction à froid.

III-4.2. Composition en acides gras

La composition en acides gras des différentes parties du fruit de *Aframomum giganteum* et *Aframomum stipulatum* est présentée dans tableau V.4. Huit (8) principaux acides gras ont été identifiés, l'acide oléique (C18 :1) est l'acide gras majeur dans les graines et les coques de

fruit de *Aframomum giganteum* et *Aframomum stipulatum* ; son taux varie de 59% à 67% dans la graine, et de 16% à 27% dans les coques de fruits. Ces résultats indiquent que cet acide gras s'accumule principalement dans la graine, l'organe cible de sa biosynthèse.

D'autres acides gras comme l'acide palmitique, stéarique, et linoléique sont présents dans les graines de ces espèces à des taux respectifs de 16 à 25 %, 5 à 8 %, et 3 à 6 %. Dans les coques de fruit, l'acide palmitique (30%) et acide linoléique (23-36 %) sont majoritaires.

Tableau II.12 : Composition en (%) par rapport aux acides gras totaux des différentes parties des fruits de *Aframomum giganteum* et *Aframomum stipulatum*.

Acides gras	<i>A. stipulatum</i>		<i>A. giganteum</i>	
	Grains	coques	graines	coques
Acide myristique (C14:0)	1,06 ± 0,04	1,50 ± 0,01	1,29 ± 0,09	1,49 ± 0,11
Acide palmitique (C16:0)	17,23 ± 0,58	27,27 ± 2,17	22,74 ± 1,86	29,24 ± 0,64
Acide palmitoléique (C16 :1n7)	0,71 ± 0,19	3,42 ± 2,52	1,71 ± 0,49	5,03 ± 3,43
Acide stéarique (C18:0)	7,34 ± 1,34	4,70 ± 0,10	4,42 ± 1,02	4,81 ± 0,11
Acide oleique (C18:1n-9)	66,8 ± 1,4	16,23± 1,53	59,46± 3,64	27,30± 0,21
Acide linoléique (C18:2n-6)	3,13 ± 0,13	32,69± 3,29	4,39 ± 1,89	24,22± 1,42
Acide α-linolenique (C18:3n-3)	1,18 ± 0,23	6,18 ± 4,83	1,35 ± 0,15	5,42 ± 0,02
Acide arachidique (C20:0)	0,49 ± 0,02	4,18 ± 0,78	0,44 ± 0,14	0,4± 0,4
Acide gadolenique (C20 :1n9)	1,18 ± 0,48	0,8 ± 0,01	1,22 ± 0,52	0,2 ± 0,2
Acide behenique (C22:0)	0,1 ±0,01	1,20 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,5 ± 0,5
Acide lignocerique (C24:0)	0,2 ± 0,02	1,65 ± 1,65	0,10 ± 0,01	1,20 ± 1,2
Acide érucique (C22:1)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Acide nervonique (C24:1)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Acides gras saturés	26,62 ± 0,92	39,15 ± 0,16	32,08 ± 2,38	41,72 ± 2,62
Acides gras insaturés	73,34 ± 0,87	58,91 ± 2,11	67,62 ± 2,08	56,69 ± 1,02
Acides gras mono-insaturés (AGMI)	69,04 ± 0,76	20,05 ± 3,65	61,89 ± 4,11	30,92 ± 1,42
Acides gras poly-insaturés (AGPI)	4,30 ± 0,11	38,86 ± 1,54	5,73 ± 2,03	25,77 ± 2,44
Ratio AGPI/AGMI	0,06 ± 0,002	2,02 ± 0,45	0,09 ± 0,04	0,84 ± 0,11
Teneur acide gras totaux (g/100g)	35,8	12,3	25,2	13,7

Les résultats de cette étude, montrent que les graines des fruits sont une source précieuse d'acides gras insaturés essentiels (figure II.5). Les acides gras poly-insaturés sont en proportion faibles dans les graines (4 à 6 %) ; néanmoins, ils s'accumulent d'avantages dans les extraits de coques de fruits (26 à 39 %), par un effet de concentration. Les acides gras polyinsaturés, sont bien connus pour leur importance dans le domaine de la nutrition et les usages en industrie pharmaceutique.

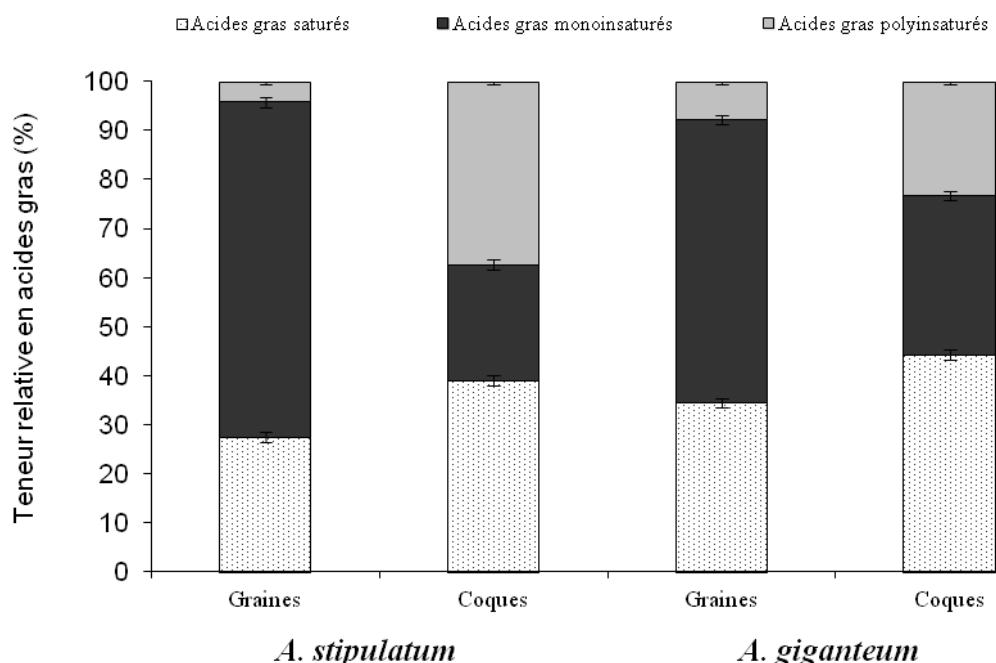


Figure II.5. : Teneur (%) en acide gras total des différentes parties du fruit de *Aframomum stipulatum* K. Schum et *Aframomum giganteum* K. Schum.

L’apport en acide oléique de *A. stipulatum* et *A. giganteum* est aussi important que celui des principaux oleagineux : olive 75% [7] ; avocat et noix de cajoux 70 % [8], colza et Gland 54 % [8, 9], arachide 47% [8], argan 45 % [10], pépin de courge 34 % [11], soja 26 % [7] et tournesol 23 % [12].

Les huiles extraites des coques de ces deux espèces présentent des teneurs élevées en acides gras saturés en C16 et C18 (environ 40 %) ; Ce qui nous emmène à les rapprocher de la classe des graisses végétales. Les graisses végétales forment un groupe particulier dont les représentants typiques sont le beurre de cacao, le beurre d’illipé et le beurre de karité [13]. Ce groupe de graisses, aussi appelé beurre végétal est caractérisé par une teneur élevée en acide gras saturé (environ 50%) associée à un bas point de fusion.

Il est à mentionner que l’analyse en chromatographie en phase gazeuse des extraits lipidiques des graines ou coques de fruits de ces deux *Aframomum* a révélé la présence de certains composés terpéniques tels que les pinènes, et le 1,8-cinéol). La présence de ces composés serait responsable de la forte odeur aromatique et piquante caractéristique de ces extraits lipidiques.

III-4.3. Composition en phytostérol

La composition en phytostérols des différentes parties des fruits de *A. giganteum* et *A. stipulatum* est présentée dans tableau II.13. Des teneurs élevées en stérols sont obtenues dans les graines et les coques, le β-Sitostérol (62%) étant le composé majoritaire dans toutes les parties du fruit. Ce composé est intéressant pour ses effets bénéfiques et physiologiques sur la santé [14].

La teneur en β-Sitostérol est comparable à celle dans l'huile d'arachide (62.3%), huile de tournesol (61.9%), mais inférieure à celle dans l'huile d'olive (85.9%) et supérieure à celle de soja (48,6%) [15].

Tableau II.13 : Composition (%) en stérols des différentes parties des fruits de *Aframomum giganteum* K. Schum et *Aframomum stipulatum* K. Schum.

Sterols	<i>A. stipulatum</i>		<i>A. giganteum</i>	
	Graines	Coques	Graines	Coques
Campesterol	10,89 ± 0,09	26,85 ± 0,22	18,91 ± 1,60	14,06 ± 0,92
Campesterol	-	0,25 ± 0,35	-	0,31 ± 0,22
Stigmasterol	14,48 ± 0,69	9,84 ± 0,26	9,44 ± 0,22	15,68 ± 0,52
β-Sitosterol	59,54 ± 1,43	55,42 ± 0,15	60,34 ± 4,84	62,44 ± 1,57
Stigmasterol	-	0,49 ± 0,37	1,89 ± 0,17	0,38 ± 0,27
Δ ⁵ -Avenasterol	10,34 ± 2,72	1,71 ± 0,19	6,61 ± 0,18	1,81 ± 0,20
Gramisterol	-	1,17 ± 0,85	1,02 ± 0,09	1,49 ± 1,09
Citrostadienol	2,40 ± 0,02	-	-	0,36 ± 0,17
Cycloartenol	-	1,35 ± 0,24	0,79 ± 0,07	2,54 ± 0,51
Methylene cycloartanol	2,34 ± 0,03	2,92 ± 0,04	0,97 ± 0,08	1,18 ± 0,83
Ratio β-sitosterol/campesterol	5,47 ± 0,17	2,06 ± 0,02	3,19 ± 0,01	4,44 ± 0,21
total Stérols (mgKg ⁻¹ huile)	241,25 ± 0,4	760,07 ± 2,36	393,78 ± 3,54	849,40 ± 3,59

Les autres stérols majeurs dans les graines de fruit de *A. stipulatum* et *A. giganteum* sont le Campesterol, Stigmastérol et Δ5-Avenasterol. Dans les coques, le campesterol et stigmastérol sont à des teneurs respectives de 14-27% et 10-16%. En revanche nous n'avons pas relevé de trace de cholestérol, lequel est spécifique aux lipides animaux, mais présent généralement à des taux bas (1-2%) dans la plupart des huiles végétales.

Par ailleurs, le ratio β -sitostérol/campésterol pourrait être utilisé comme un index pour identifier la pureté et authenticité des huiles comme dans le cas du coriandre et cumin noir [16-18]. Dans l'étude présente, le ratio du β -sitostérol/campésterol est respectivement de 5,5 dans huile de la graine de *Aframomum stipulatum* et 3,2 dans celle de *Aframomum giganteum*. Dans l'huile des coques de fruit les ratios sont respectivement 2,0 et 4,4. Les phytostérols sont d'un grand intérêt du fait de leur activité antioxydante et de leur impact positif sur la santé [19-22]. De plus, l'analyse de stérols fournit un outil puissant pour le contrôle de la qualité des huiles végétales et pour la caractérisation des huiles adultérées [20, 22-24].

III-4.4. Composition en tocophérols

Le tableau II.14 fournit la composition en tocophérols des graines des deux *Aframomum* étudiés.

Les teneurs en tocophérols totaux dans les huiles de graines sont $13,30 \text{ mg.Kg}^{-1}$ huile pour *Aframomum stipulatum* K. Schum et de $523,20 \text{ mg.Kg}^{-1}$ pour *Aframomum giganteum* K. Schum. Dans l'extrait des graines de *Aframomum giganteum*, un fort taux en γ -tocotrienol (84 %) a été observé. Cependant, dans l'huile de *Aframomum stipulatum*, le composé majoritaire de la fraction tocophérol est le γ -tocopherol (69%) suivi du δ -tocopherol (17 %) et du α -tocopherol (13%). On note que les formes γ - et δ - des tocophérols naturels sont les plus importantes dans l'huile de graines de *Aframomum stipulatum* et *Aframomum giganteum*; l'absence de β -tocophérols dans la fraction tocophérol de l'huile de ces graines est remarquée.

Tableau II.14 : Composition en tocopherols et tocotrienol (%) des graines de *Aframomum giganteum* et de *Aframomum stipulatum*

Tocopherol & tocotrienol	<i>A. stipulatum</i>	<i>A. giganteum</i>
	Graines	Graines
α -Tocopherol	$13,35 \pm 0,08$	$0,57 \pm 0,10$
γ -Tocopherol	$69,17 \pm 0,15$	$14,46 \pm 0,16$
δ -Tocopherol	$17,29 \pm 0,37$	$0,83 \pm 0,50$
γ -Tocotrienol	-	$84,14 \pm 0,25$
Ratio Tocopherol/Tocotrienol	-	0,19
total tocopherols (mgKg $^{-1}$ huile)	$13,30 \pm 0,43$	$523,20 \pm 3,59$

La prédominance des formes γ -, δ -tocophérols et γ -tocotrienols dans les fractions tocopherols des huiles de graines de ces Aframomum permet de conférer un pouvoir antioxydant à cette fraction lipidique supérieur à son pouvoir vitaminique [25].

III-5. Etude phytochimique du fruit de *Spondias mombin* L.

III-5.1. Evaluation de la teneur en lipides totaux des différentes parties du fruit de *Spondias mombin* L.

La caractérisation de la composition du fruit de *Spondias mombin* L. a donné lieu aux observations suivantes : la peau (épicarpe) du fruit représente 16 % de la masse totale du fruit, la pulpe à un poids situé entre 50 et 52 % du fruit sec et le noyau (endocarpe) représente 33 % du fruit sec. A l'intérieur du noyau, se trouvent des amandes qui sont difficiles à extraire. Ces observations sont proches de celles présentées par Bora et coll. [26]

La figure II.6 présente les teneurs en lipides de différentes parties de fruit de *Spondias mombin* L.

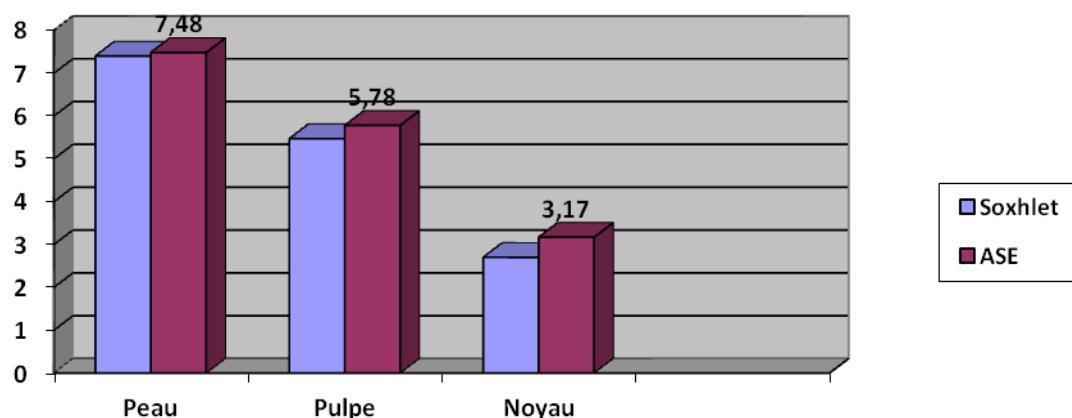


Figure II.6. : Teneurs en lipides des différentes parties du fruit de *Spondias mombin* L. obtenues par les méthodes soxhlet et ASE

La teneur en lipides est plus élevée dans la peau du fruit (7 %) que dans les autres parties tels que la pulpe (5,7 %) et le noyau (3 %). La teneur en lipides obtenue par l'extraction au Soxhlet de la pulpe de fruit (5%) est nettement bien supérieure comparée aux données de la littérature qui indiquent 2% selon les travaux de Adepoju [27].

III-5.2. Analyse de la fraction lipidique des différentes parties du fruit de *Spondias mombin L.*

III-5.2.1. Composition en acides gras

Les acides gras libres constituent respectivement 19,1 ; 50,8 et 83,5 % de la fraction lipidique de la peau, de la pulpe et du noyau de fruit de *Spondias mombin L.* (tableau II.15).

Tableau II.15 : Composition (%) en acides gras des différentes parties des fruits de *Spondias mombin L.*

Acides gras	<i>Spondias mombin L.</i>		
	Peau	Pulpe	Noyau
Acide laurique (C12:0)	-	0,9 ± 0,21	2,7 ± 0,16
Acide myristique (C14:0)	2,2 ± 0,07	3,1 ± 0,17	1,3 ± 0,11
Acide palmitique (C16:0)	18,8 ± 0,45	22,9 ± 0,22	19,7 ± 0,15
Acide palmitoléique (C16:1n7)	2,2 ± 0,11	1,2 ± 0,07	0,4 ± 0,17
Acide stéarique (C18:0)	3,4 ± 0,07	4,5 ± 0,12	4,7 ± 0,09
Acide oleique (C18:1n-9)	35,6 ± 1,19	33,0 ± 0,32	23,6 ± 0,27
Acide linoléique (C18:2n-6)	10,7 ± 0,06	21,4 ± 0,18	44,7 ± 1,15
Acide α-linolenique (C18:3n-3)	10,7 ± 0,58	6,2 ± 1,14	0,5 ± 0,21
Acide arachidique (C20:0)	3,4 ± 0,89	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,17
Acide gadolenique (C20:1n9)	1,4 ± 0,03	1,1 ± 0,08	0,4 ± 0,13
Acide behenique (C22:0)	4,2 ± 0,63	1,7 ± 0,29	0,3 ± 0,18
Acide érucique (C22:1)	0,2 ± 0,03	0,3 ± 0,17	< 0,1
Acide lignocerique (C24:0)	2,4 ± 0,18	1,4 ± 0,21	0,3 ± 0,14
Acide nervonique (C24:1)	2,0 ± 0,03	0,5 ± 0,2	< 0,1
NI	27,92 ± 2,8	-	-
Acides gras saturés	34,4 ± 1,63	35,2 ± 1,87	29,5 ± 0,69
Acides gras insaturés	62,8 ± 0,86	64,8 ± 2,68	70,5 ± 0,38
Acides gras mono-insaturés (AGMI)	41,4 ± 1,25	36,1 ± 1,31	24,4 ± 0,12
Acides gras poly-insaturés (AGPI)	21,4 ± 0,58	27,6 ± 0,45	45,2 ± 0,23
Ratio AGPI/AGMI	0,52 ± 0,18	0,76 ± 0,02	1,85 ± 0,42
Acide gras totaux (%)	19,1	50,8	83,5

Les acides gras sont essentiellement des insaturés : peau : 63 % ; pulpe : 64 % ; noyau de fruit : 71 %. Le composé majeur dans la peau et la pulpe de fruit est l'acide oléique à des teneurs respectives de 35,6 et 33 %. Les acides gras saturés représentent 29 à 34 % ; l'acide palmitique est le représentant avec une teneur variant de 18,8 à 22,9 %.

A l'exception de l'huile extraite du noyau de fruit qui présente un teneur élevée en acide gras totaux, les autres organes du fruit donnent de faible valeur en acides gras totaux.

Il convient de mentionner dans la fraction lipidique la présence d'acides gras à longue chaîne tels que les C22 et C24.

Lors de l'analyse du profile d'acides gras de l'extrait de la peau de fruits de *Spondias mombin* L., on observe la présence d'un composé non identifié (NI) qui représente 25 à 33% des acides gras. Des analyses supplémentaires en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, nous ont permis d'identifier ce composé de masse moléculaire de 436 comme étant un hydrocarbure aliphatique saturé formule brute C₃₁H₆₄. Le spectre de masse de ce composé est présenté en annexe (Spectre.1). Cet alcane pourrait être responsable de cette consistance de l'extrait lipidique de la peau, laquelle se rapproche de celle d'une cire ou d'une fraction concrète de matières grasses à température ambiante. La présence de cet hydrocarbure hentriaccontane (C₃₁H₆₄) a été signalé dans la cire de plusieurs espèces de plantes [29].

III-5.2.2. Détermination de la composition en phytostérols

L'identification des stérols par leurs temps de rétention relatif a été réalisée en prenant le cholestanol comme référence et standard interne. La nature des stérols identifiés est présentée dans le tableau VI-2. La teneur en stérols totaux est respectivement de 266,91 ; 161,63 et 64,6 mg/100g de matière grasse de la peau, de la pulpe et du noyau de fruit.

Les stérols majoritaires dans les différentes parties du fruit sont : β-sitostérol, Δ5-avenasterol, campesterol, citrostadiénol, stigmasterol, Δ7-stigmastenol. Le β-sitostérol est majoritaire avec des pourcentages respectifs de 65,3% ; 68,86 et 73,87 %.

Les traces de cholestérol ont été observées dans les différentes parties du fruit à des taux inférieurs à 1%.

Tableau II.16 : Composition (%) en stérols de l'huile des différentes parties du fruit de *Spondias mombin L.*

Stérols	<i>Spondias mombin L.</i>		
	Peau	Pulpe	Noyau
Cholestérol	0,57 ± 0,29	0,88 ± 0,29	0,60 ± 0,02
Campestérol	7,95 ± 1,72	6,46 ± 0,13	8,42 ± 0,23
Stigmatérol	1,44 ± 0,26	1,16 ± 0,01	7,67 ± 0,14
β-Sitostérol	65,29 ± 2,29	68,86 ± 0,30	73,87 ± 3,03
Stigmatanol	-	1,11 ± 0,06	0,37 ± 0,38
Δ5 Avénastérol	11,43 ± 2,9	8,48 ± 0,01	1,01 ± 0,12
Δ7 Stigmasténol	-	0,48 ± 0,04	0,29 ± 0,1
Δ7 Avénastérol	-	0,52 ± 0,07	0,17 ± 0,09
Citrostadiénol	6,88 ± 1,84	4,97 ± 0,82	2,29 ± 0,09
Cycloarténol	3,81 ± 0,03	3,79 ± 0,04	6,26 ± 2,15
Méthylène cycloarténol	2,58 ± 0,66	3,25 ± 0,9	1,14 ± 0,01
Ratio β-sitosterol/campesterol	8,21 ± 1,5	10,66 ± 1,41	8,78 ± 0,53
total Sterols (mg/100g huile)	266,91 ± 8,89	161,63 ± 6,19	64,61 ± 1,97

L'apport en phytostérol du fruit de *Spondias mombin* est plus élevé dans la peau de fruit que dans la pulpe.

III-5.2.3. Composition en tocophérols

La teneur de l'extrait lipidique de la peau et de la pulpe de fruit de *Spondias mombin* en tocophérols est approximativement de 170 et 23 mg/kg, le majoritaire étant le α-tocophérol suivi du γ-tocophérol avec des teneurs respectives de 70,6% et 78,2% dans la peau et de 21,2% ; 21,79% dans la pulpe (tableau II.17).

En plus de leur rôle indéniable dans la stabilisation de l'auto-oxydation, les tocophérols constituent aussi une source alimentaire importante en vitamines. La présence du γ-tocophérol à des teneurs de 21% apporterait un pouvoir antioxydant [30] aux fractions lipidiques de ces parties de fruits couramment consommées par les populations.

Tableau II.17 : Composition en tocopherol (%) dans la peau et pulpe de fruit de *Spondias mombin*

Tocophérol & tocoriénoïl	<i>Spondias mombin L.</i>	
	Peau	Pulpe
α-Tocophérol	70,65 ± 0,07	78,21 ± 1,23
β-Tocophérol	3,66 ± 0,21	-
γ-Tocophérol	21,26 ± 0,23	21,79 ± 0,51
δ-Tocophérol	4,43 ± 0,37	-
Tocopherols totaux (mgKg ⁻¹ huile)	178,20 ± 0,43	23,4 ± 0,43

III-5. 3. Conclusion

En comparaison avec les autres plantes oléagineuses à fort taux de bioaccumulation de lipides de réserve, les trois parties du fruit explorées ont donné des faibles teneurs en substances lipidiques (3 % dans les noyaux du fruit, 6 % dans la pulpe ; 8 % dans la peau en matière grasse). Le profil en acides gras de la peau et de la pulpe de fruit présente respectivement l'acide oléique et palmitique comme composés majeurs de ces fractions, tandis que dans le noyau du fruit, les acides linoléique et oléique sont en fortes proportions. Le dosage des tocophérols de la peau et de la pulpe de *Spondias mombin* révèle une prédominance en α-tocophérol (70 %) laissant entrevoir un potentiel pouvoir vitaminique de ces parties. De plus, la fraction lipidique de la peau de fruit de *Spondias mombin* contient une cire constituée d'un hydrocarbure à longue chaîne de formule brute C₃₁H₆₄. À notre connaissance, c'est la première fois que cet hydrocarbure que la présence de cet hydrocarbure le untriacentane est mise en évidence dans le fruit de *Spondias mombin* L.

III-6. Etude phytochimique de l'amande de *Nephelium lappaceum* L.

III-6.1. Evaluation de la teneur en lipides totaux de l'amande de *Nephelium lappaceum*

La figure II.7 présente les teneurs en huile de l'amande de *Nephelium lappaceum* L., obtenues par les techniques d'extraction au Soxhlet et d'extraction accélérée par solvant (ASE). Au terme de l'optimisation du procédé d'extraction de l'huile par ASE en utilisant le cyclohexane (temps d'extraction nécessaire : 4 cycles de 10 min, pression : 100 bars, température : 105°C), la teneur en lipides totaux de la graine collectée a été de 36 %. L'extraction au Soxhlet, nous donne des teneurs en huile de 35 % avec des temps d'extraction maximum de 6 à 7 heures.

Ces résultats sont en accord avec les valeurs obtenues dans la littérature [30-32] qui annoncent une teneur en huile de 33 à 42 %.

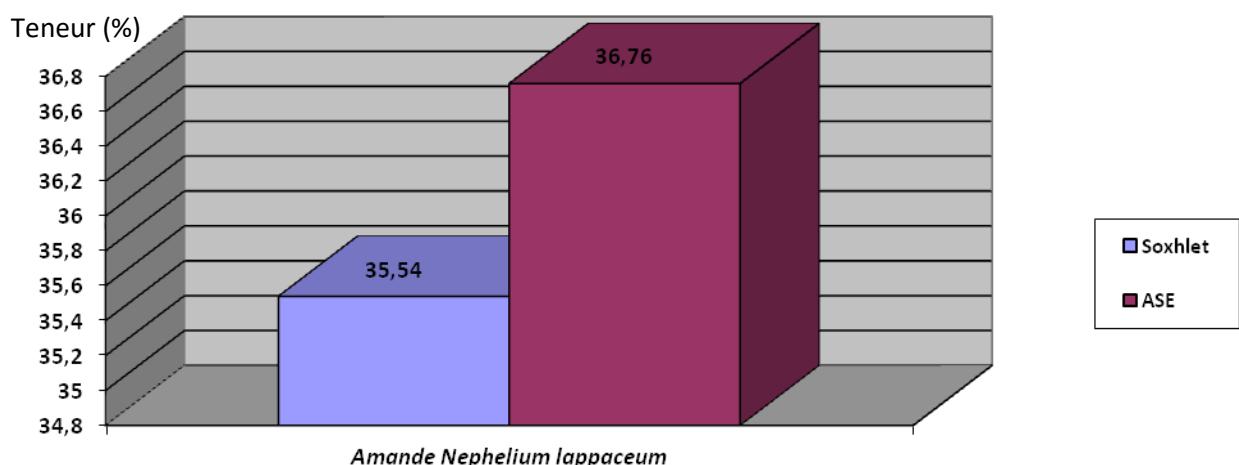


Figure II.7 : Teneur (%) en huile obtenu par les méthodes au Soxhlet et par ASE (extraction accélérée par solvant) de l'amande de *Nephelium lappaceum* L.

L'extraction par la méthode de Bligh & Dyer a conduit à des teneurs en huile autour de 30 % alors que l'extraction à froid permet d'obtenir un rendement de 29 % par rapport à la matière sèche de l'amande.

III-6.2. Analyse de la fraction lipidique des amandes de fruits de *Nephelium Lappaceum* L.

III-6.2.1. Composition en acides gras

Les lipides extraits des graines de *Nephelium lappaceum* sont constitués de triglycérides riches en acides gras insaturés de la série des omega-9. Le profil en acide gras présenté dans le tableau II.18 est dominé par l'acide oléique C18:1 (44%), suivi de l'acide arachidique C20:0 (29 %) ; ces résultats sont comparés avec ceux rencontrés dans la littérature [30, 32, 33]. Les graines de Thaïlande ont des teneurs élevées en acides oléiques allant jusqu'à 55%. Les graines de Mexique et du Congo ont une composition très proche en constituants majeurs (tableau II.18).

La présence de l'acide arachidique (C20 :0) et de l'acide gadolenique C20 :1 à des teneurs élevées dans cette fraction lipidique est d'autant plus intéressante que ces acides gras sont rares dans le règne végétal. Dans la plupart des autres huiles du règne végétale, ces acides sont des composés mineurs sauf dans trois plantes *Aporrhiza nitida* Gilg ; *Litchi chinensis* ; *Koelreuteria paniculata* [33] où leurs teneurs sont supérieures à 7%. De plus selon certains auteurs [31] la présence, de ces acides confère à l'huile des propriétés physicochimiques et une stabilité thermiques. C'est dans le règne animal que l'on rencontre des teneurs élevées en acide gadolénique: sardine 17 % ; morue 19 %.

Tableau II.18 : *Composition (%) en acides gras de Nephelium lappaceum du Congo comparée à celles de graines de Thaïlande et du Mexique.*

Acides gras	<i>Nephelium lappaceum L.</i>		
	Ce travail Amande	Graines Thaïlande*	Gaines Mexique**
Acide myristique (C14:0)	< 0,1	0,11	nd
Acide palmitique (C16:0)	4,9 ± 0,13	8,77	6,1
Acide palmitoléique (C16 :1n7)	0,6 ± 0,18	0,96	1,5
Acide stéarique (C18:0)	6,3 ± 0,26	7,25	7,1
Acide oleique (C18:1n-9)	44,7 ± 0,47	55,25	40,3
Acide linoléique (C18:2n-6)	2,7 ± 0,32	3,72	nd
Acide α-linolenic (C18:3n-3)	0,3 ± 0,17	0,26	nd
Acide arachidique (C20:0)	28,6 ± 0,58	22,05	34,5
Acide gadolenique (C20 :1n9)	8,1 ± 0,22	nd	6,3

Acide behénique (C22:0)	2,6 ± 0,03	1,23	2,9
Acide érucique (C22:1)	0,7 ± 0,21	nd	nd
Acide lignocérique (C24:0)	0,4 ± 0,19	nd	nd
Acide nervonique (C24:1)	< 0,41	nd	nd
Acides gras saturés	42,8	39,41	50,7
Acides gras insaturés	57,2		
Acides gras mono-insaturés (AGMI)	54,1	56,21	48,1
Acides gras poly-insaturés (AGPI)	3,0	3,98	-
Ratio AGS/AGMI	0,79	0,70	1,05
Teneur en Acide gras totaux (%)	92		

Nd: non déterminer ; (*) : données de Winayanuwattikun [32] ; (**) : données de Solis-Fuentes [33]

III-6.2.2. Composition en phytostérols

La teneur en stérols totaux dans la graine de *Nephelium lappaceum* est de 294 mg/kg d'huile. Au total six (6) stérols a été identifiés. Leur composition est reportée dans le tableau II.19. Le 7-stigmastérol et le 7-stigmasterol sont dominants avec des pourcentages respectifs de 71,61% et 12,86%. La graine de *N. lappaceum* est une source naturelle et spécifique des Δ7, 24α-éthyl-stérols, constituants mineurs non usuels parmi les stérols des graines des plantes. On les rencontre plutôt dans les extraits de peau de tissus de Curcubitaceae [34].

Tableau II.19 : Composition (%) en stérols de l'amande de Nephelium lappaceum L.

Stérols	<i>Nephelium. lappaceum L.</i>
	Amande
Campestérol	2,62 ± 0,34
Stigmastérol	71,61 ± 10,2
β-Sitostérol	4,26 ± 0,14
Stigmasterol	12,86 ± 2,29
Δ7Avénastérol	1,70 ± 0,63
Citrostadiénol	7,01 ± 0,07
Ratio β-sitosterol/campesterol	1,62
total Sterols (mgKg ⁻¹ huile)	294,6 ± 5,31

III-6.2.3. Composition en tocophérols

Le dosage des tocophérols par chromatographie liquide à haute performance de l'extrait de l'huile de *Nephelium lappaceum* a montré la présence exclusive de α -tocophérol à une teneur égale à 108 mg/kg de matière grasse. Le α -tocophérol confère à l'huile un fort pouvoir vitaminique.

Tableau II.20 : Composition en tocophérol (%) des graines de *Nephelium lappaceum L.*

Tocopherol & tocotrienol	<i>Nephelium lappaceum L.</i>	
	Amandes	
α -Tocopherol	100	
β -tocophérol	-	
γ -Tocopherol	-	
δ -Tocopherol	-	
total tocopherols (mgKg ⁻¹ huile)		108 ± 2,7

III-6.2.4. Conclusion

L'amande de *Nephelium lappaceum* collecté au Congo présente des teneurs en huile de l'ordre de 30 à 37%. Son profil acide gras montre trois (3) acides gras majeurs, l'acide oléique à 45 %, l'acide arachidique à 30 % et l'acide gadoléique à 8%, un profil quasi-similaire avec celui des graines du Mexique. Les stérols totaux constituent 29 % de la matière grasse et le stigmastérol et le stigmasterol étant les stérols majoritaires. La présence unique de l'alpha tocophérol à une teneur égale à 108 mg/kg de matière grasse, confère à l'huile un pouvoir vitaminique très important. La stabilité de cette huile relève du rapport acides gras monoinsaturés/acides gras saturés en faveur des premiers. Ce rapport est de l'ordre de 1,26. Nous pensons qu'il est meilleur sans la dégradation hydrolytique des TAG observée pendant les différents stades de récolte, transport et stockage d'échantillons.

Le rendement élevé d'extraction et la forte teneur en acide arachidique comparés aux valeurs obtenues pour d'autres huiles du règne végétal ou animal, font de la graine de *N. lappaceum* une matière intéressante pour son utilisation en tant que graine.

IV- CONCLUSION

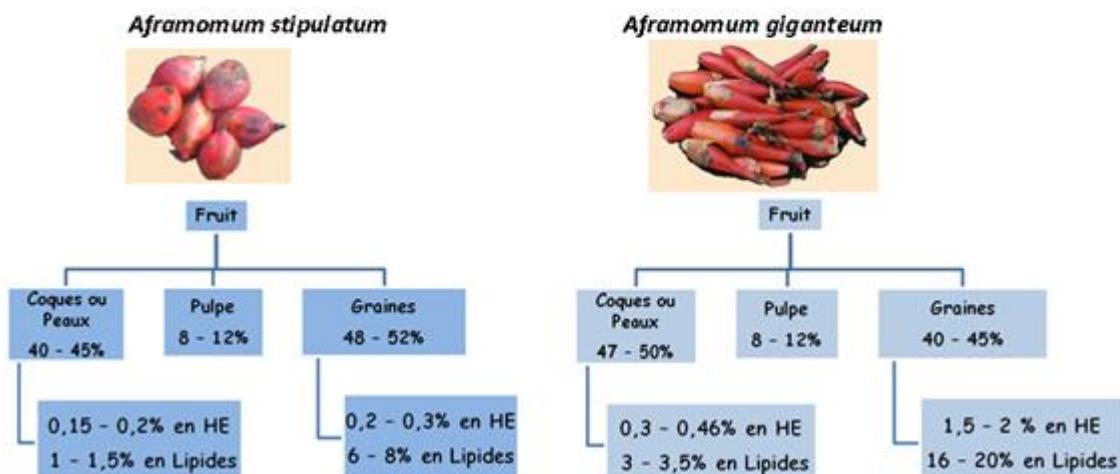
Les planches 1, 2, 3 présentent les fruits et graines saisonniers utilisés comme ressources végétales pour établir la connaissance des constituants organiques majeurs et mineurs de leurs organes de bioaccumulation des huiles essentielles et de lipides de réserve.

On note que les fruits des deux espèces de *Aframomum* sont des sources d'huiles essentielles et de lipides de réserve et peuvent donc être classé dans les "Aroma-tincto-oleo-crops".

Le fruit de *Spondias mombin* L. et l'amande de *Nephelium lappaceum* L. sont des sources de lipides de réserve. Les différentes parties du fruit de *Spondias mombin* présentent un profil acide gras dominé par les acides palmitique, oléique et linoléique, avec une présence marquée de l'hentriaccontane dans l'huile de peaux de fruits. L'huile d'amande de *Nephelium lappaceum* se distingue par sa richesse en acide arachidique C20:0 et acide 11-eicosénoïque C20:1.

□ Les Aframomum

Famille de zingiberaceae,



- Plantes à huiles essentielles
- Plantes à lipides de réserve ou à huile "végétale"

◆ Classe des Aroma-tincto-oleo-crops

PLANCHE 1 : Présentation des teneurs en huiles essentielles et en lipides de réserve

dans les graines et coques de fruit de *Aframomum stipulatum* K. Schum
et *Aframomum giganteum* K. Schum

Cas: Graines de *Aframomum giganteum*

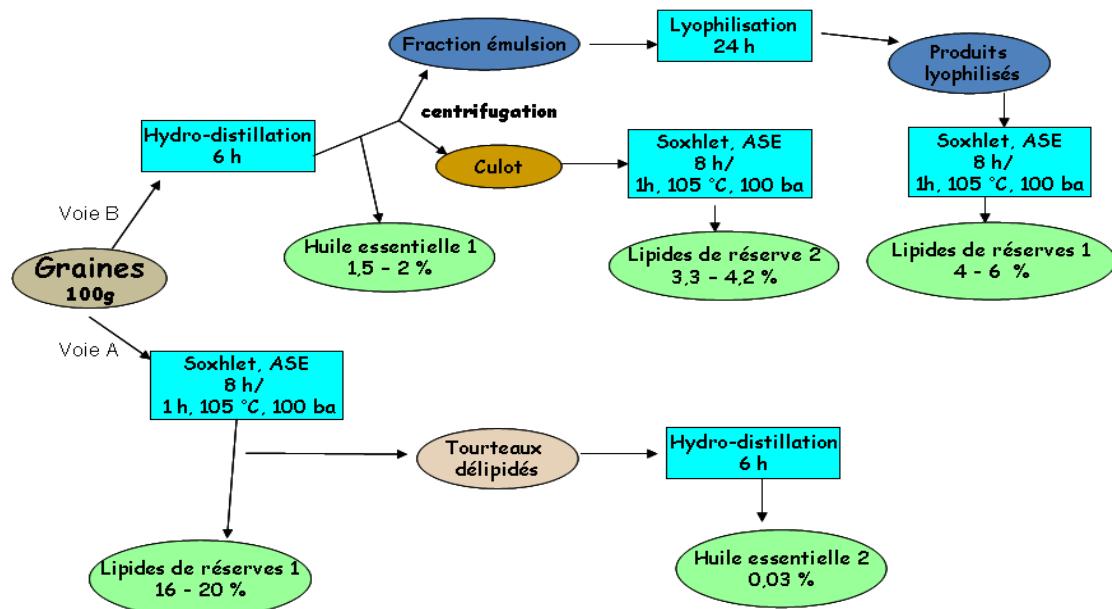
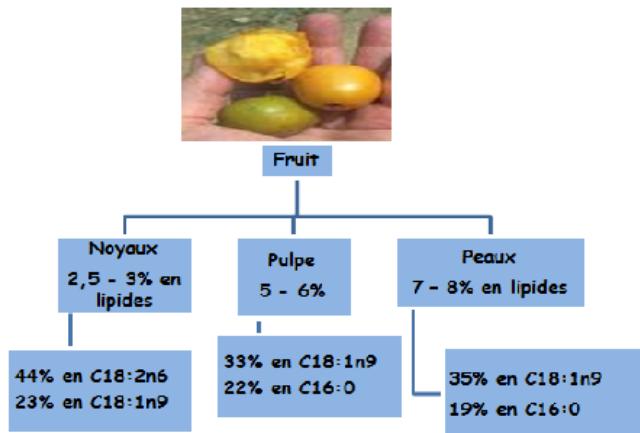


PLANCHE 2 : Schéma d'une libération séquencée de l'huile essentielle et de lipides de réserve par extraction continue

Deux plantes riches en acides gras

- *Spondias mombin L.*
Famille de Anacardiaceae



- *Nephelium lappaceum L.*
Famille Sapindaceae

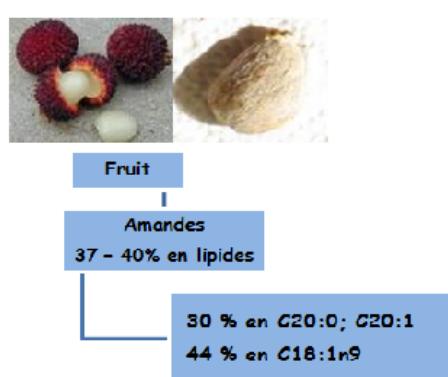


PLANCHE 3 : Teneur en lipide et en acides gras majoritaires de différentes parties du fruit de *Spondias mombin* et de *Nephelium lappaceum*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoca A., Gmira N., *Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, Thymelaea lythroides*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, , 2003. **142**: p. 61-78.
2. Bouquet A., *Plantes Médicinales du Congo (Brazzaville)*. 1972, O.R.S.T.O.M.: Paris. p. 11-15.
3. Vollhardt K.P.C., Schore N.E., *Organic chemistry : structure and function.* , Ed, Editor. 2003, W.H. Freeman & Co: New york. p. 1297.
4. Doherty V.F., Olaniran O.O., Kanife U.C., *Antimicrobial Activities of Aframomum Melegueta (Alligator Pepper)*. International Journal of Biology 2010. **2**(2): p. 126-131.
5. Müller K.-D., Husmann H., Nalik H.P., Schomburg G. , *Trans-esterification of fatty acids from microorganisms and human blood serum by trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) for GC analysis*. Chromatographia, 1990. **30**(5-6): p. 245-248.
6. Ouamba J.-M., *Valorisation chimique des plantes aromatiques du Congo. Extraction et analyse des huiles essentielles. Oximation des aldéhydes naturels.*, in *Sciences*. 1991, Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc: Montpellier. p. 341.
7. Cabrini L., Barzanti V., Cipollone M., Fiorentini D., Grossi G., Tolomelli B., Zambonin L., Landi L., *Antioxidants and Total Peroxyl Radical-Trapping Ability of Olive and Seed Oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(12): p. 6026-6032.
8. Erasmus, U., *Fats that heal, fats that kill: the complete guide to fats, oils, cholesterol and human health*, in *Alive books*. 1993. p. 456.
9. Lampi A.M., Piironen V., *Dissimilarity of the oxidations of rapeseed and butter oil triacylglycerols and their mixtures in the absence of tocopherols*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999. **79**: p. 300-306.
10. Khalouki F., Spiegelhalder B., Bartson H., Owen R.H., *Secondary metabolites of the argan tree (Morocco) may have disease prevention properties*. African Journal of Biotechnology, 2005. **4**(5): p. 381-388.
11. Murkovic M., Pfannhauser W., *Stability of pumpkin seed oil*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2000. **102**(10): p. 607-611.
12. Warner K., Vick B.A., Kleingartner L., Isaak R., Doroff K., *Compositions of sunflower, nusun (mid-oleic sunflower) and high oleic sunflower*. 2006.
13. Bewley D.J., Black M., Halmer P., *The encyclopedia of seeds: science, technology and uses*. Vol. 1. 2006: Wallingford, UK XIII-828 p.

14. Yang B., Karlsson R.M., Oksman P.H., Kallio H.P., *Phytosterols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides L.*) berries: identification and effects of different origins and harvesting times*. Journal Agricultural Food Chemistry 2001. **49**(11): p. 5620-5629.
15. Stambouli H., El Bouri A., Bouayoun T., Bellimam M.A., *Caractérisation de l'huile de graines de Cannabis sativa L. cultivé au nord du Maroc*. Annales de Toxicologie Analytique, 2006. **XVIII**(2): p. 119 - 125.
16. Sriti J., Talou T., Wannes W.A., Cerny M., Marzouk B., *Essential oil, fatty acid and sterol composition of Tunisian coriander fruit different parts*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009. **89**(10): p. 1659-1664.
17. Harmrouni-Sellami I., Kchouk M.E., Marzouk B., *Lipid and Aroma composition of Black cumin (*Nigella sativaL.*) seed from Tunisia*. Journal of Food Biochemistry, 2008. **32**(3): p. 335-352.
18. Nergiza C., Ötelsa S., *Chemical composition of Nigella sativa L. seeds*. Food Chemistry, 1993. **48**(3): p. 259-261.
19. Ramadan M.F., Mörsel J.T., *Oil composition of coriander (*Coriandrum sativum L.*) fruit-seeds*. European Food Research and Technology, 2002. **215**(3): p. 204-209.
20. Alignan M., Roche J., Bouniols A., Cerny M., Moulongui Z., Merah O., *Effects of genotype and sowing date on phytostanol-phytosterol content and agronomic traits in wheat under organic agriculture*. Food Chemistry, 2009. **117**(2): p. 219-225
21. Roche J., Alignan M., Bouniols A., Cerny M., Moulongui Z., Vear F., Merah O., *Sterol content in sunflower seeds (*Helianthus annuus L.*) as affected by genotypes and environmental conditions*. Food Chemistry, 2010b. **121**(4): p. 990-995.
22. Crane S., Aurore G., Joseph H., Moulongui Z., Bourgeois P., *Composition of fatty acids triacylglycerols and unsaponifiable matter in *Calophyllum calaba L.* oil from Guadeloupe*. Phytochemistry, 2005. **66**(15): p. 1825-1831.
23. Roche J., Alignan M., Bouniols A., Cerny M., Moulongui Z., Vear F., Merah O., *Sterol concentration and distribution in sunflower seeds (*Helianthus annuus L.*) during seed development*. Food Chemistry, 2010a. **119**(4): p. 1451-1456.
24. Dutta P.C., Helmersson S., Kebedu E., Alemaw G., Appelqvist L.-Å., *Variation in lipid composition of Niger seed (*Guizotia abyssinica cass.*) samples collected from different regions in Ethiopia*. Journal of the American Oil Chemists' Society 1994. **71** (8): p. 839-843.
25. Kamal-Eldin A., Appelqvist L.A., *The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols*. Lipids, 1996. **31**(671-701).

26. Bora P.S., Narain N., Holschuh Heinz J., Vasconcelos M.A.S., *Changes in Physical and Chemical Composition during Maturation of Yellow Mombin (Spondias mombin) Fruits*. Food Chemistry 1991. **41**: p. 341-348.
27. Adepoju O.T., *Proximate composition and micronutrient potentials of three locally available wild fruits in Nigeria*. African Journal of Agricultural Research, 2009. **4**(9): p. 887-892.
28. Tessmann D.J., Dianese J.C., *Hentriacontane: A leaf hydrocarbon from Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of urediniospores of *Puccinia psidii*. Fitopatologia Brasileira, 2002. **27**(5): p. 538-542.
29. Tiburski J.H., Rosenthal A., Deliza R., Godoy R.L.O., Pacheco S., *Nutritional Properties of Yellow Mombin (Spondias mombin L.) Pulp*. Food Research International, 2011.
30. Winayanuwattikun P., Kaewpiboom C., Piriyakananon K., Tantong S., Thakern k.W., Chulalaksananukul W., Yongvanich T., *Potential plant oil feed stock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand*. Biomass and bioenergy, 2008. **32**: p. 1279-1286.
31. Solís-Fuentes J.A., Camey-Ortiz G., Hernández-Medel M.d.R., Pérez-Mendoza F., Durán-de-Bazúa C., *Composition, phase behavior and thermal stability of natural edible fat from rambutan (Nephelium lappaceum L.) seed*. Bioresource Technology, 2010. **101**: p. 799-803.
32. Augustin M.A, Chua B.C., *Composition of Rambutan Seeds*. Pertanika, 1988. **11**(2): p. 211-215.
33. Aitzetmüller K., Ngoy-Kihuya.E., Kitwa-Kabila I., *Sumbi-Öl aus Nordost-Katanga und Süd-Kivu (Demokratische Republik Kongo)*. Fett/Lipid 1998. **100**(7): p. 308-312.
34. Wang C.Y., Kramer G.F., Whitaker B.D., Lusby W.R., *Temperature preconditioning increases tolerance to chilling injury and alters lipid composition in Zucchini squash*. Journal of plant physiology, 1992. **140**: p. 229-235.

CHAPITRE III : Lipotransformation des lipides de réserve de *Néphelium lappaceum* L. : étude des propriétés physiques des binaires en acides gras, en monoglycérides et diglycérides saturés C20:0 et monoinsaturés C18:1, C20:1

I- INTRODUCTION

L'industrie oléochimique utilise de nombreuses voies et réactions chimiques de transformation des huiles ou triglycérides en dérivés oléochimiques. Nous nous sommes intéressés à ces transformations lipochimiques afin de valoriser la diversité de composition en acides gras des espèces non conventionnelles abordées dans ce travail. Cette étude porte sur les transformations des lipides de réserve de l'espèce *N. Lappaceum* qui constituera notre modèle d'étude exploratoire du passage des triglycérides natifs vers les triglycérides homogènes. L'effet de la composition en acides gras avec dans les systèmes binaires acides gras saturés/acides gras insaturés, sur les propriétés physiques et physico-chimiques des molécules d'acides gras et des monoglycérides sera particulièrement étudié. Les acides gras proviennent des triglycérides natifs et seront transformés en monoglycérides qui ouvrent la voie de synthèse des triglycérides homogènes.

La première étape dans la lipotransformation des lipides de réserve de *N. Lappaceum* est l'hydrolyse des triglycérides natifs libres selon un procédé breveté par Mouloungui et Mechling[1]. C'est la méthode par excellence de l'oléobioraffinerie que notre équipe applique systématiquement aux lipides de réserve de graines entières des plantes oléoprotéagineuses industrielles, émergentes ou domestiques avec l'avantage majeur de la séparation triphasique des constituants lipidiques majeurs en émulsion. Appliquée aux huiles végétales brutes, semi-brutes ou raffinées, la répétabilité et la reproductibilité ont toujours été montrées.

La deuxième étape est l'étude de l'estérification des acides gras natifs en conditions catalytiques [2]. Les étapes sont menées en milieux organisés constitués de molécules tensioactives natives (de phospholipides, de protéines membranaires)[3] ou des molécules générées *in situ* (mono-, diglycérides) au fur et à mesure que leur concentration augmente [2]. Des formes organisées sont des micelles sphériques, des vésicules, des phases cubiques, lamellaires, hexagonales... En génie de la réactivité lipochimique, ces structures sont utilisées

comme des microréacteurs. Elles présentent l'avantage de réaliser les réactions réversibles lipochimiques dans des conditions expérimentales d'autant moins énergivores que les réactifs sont localisés et concentrés. La transformation efficace des triglycérides natifs ou libres peut être envisagée par couplage de voie bio-catalytique et voie chimio-catalytique.

II- HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES TRIGLYCÉRIDES NATIFS

Cette voie a été choisie pour libérer les acides gras constitutifs des triglycérides natifs de l'espèce *N. lappaceum*, première étape dans la lipotransformation des lipides de réserve.

II-1. Etude bibliographique de la réaction d'hydrolyse enzymatique des triglycérides

La réaction d'hydrolyse des triglycérides correspond à la rupture des trois liaisons carboxyesters établies entre les acides gras et la molécule de glycérol dans les triglycérides (figure III.1).

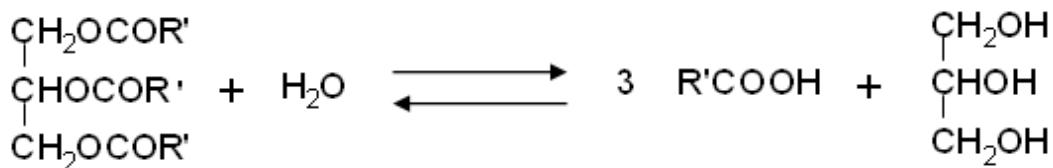


Figure III. 1 : Réaction d'hydrolyse des triglycérides.

Les lipases sont des protéines qui possèdent une activité catalytique capable d'hydrolyser les liaisons esters. D'après la classification numérique des enzymes, elles adoptent l'EC 3.1.1.314, qui correspond aux triacylglycérolacylhydrolases. Ces macromolécules appartiennent à la famille des hydrolases (EC 3) qui réagissent au niveau des liaisons ester (EC 3.1) du groupe carboxylique (EC 3.1.1) des triglycérides (EC 3.1.1.3) (figure III.2).

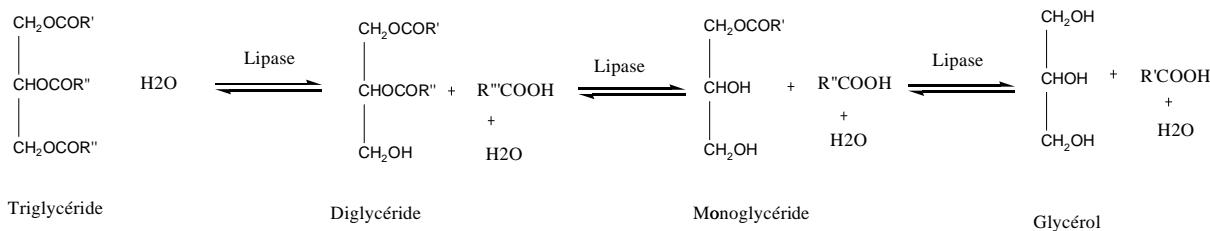


Figure III. 2: Mécanisme d'action général des lipases dans la transformation des lipides.

L'utilisation des lipases permet une économie d'énergie car les conditions de pression et température sont modérées. De plus, les lipases sont des catalyseurs d'origine biologique et présentent souvent une haute sélectivité.

L'activité catalytique d'une lipase est définie comme étant la vitesse initiale de la cinétique de la réaction. Cela correspond au nombre de moles d'acides gras générés dans un temps déterminé. Si la vitesse est divisée par la quantité de lipase introduite, nous parlerons d'une activité spécifique (AS) exprimé en $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ ou UL/g (Unité Lipase) :

$$\text{AS} = \frac{\Delta n_{AG}}{m_E \times \Delta t}$$

où :

Δn_{AG} représente la quantité de moles d'acides gras libérés dans un temps Δt ;

Δt est l'intervalle de temps dans lequel la vitesse de production du produit est constante ;

m_E correspond à la quantité d'enzyme utilisée.

La lipase utilisée ici est issue de la levure *Candida rugosa*, et fait partie des triacylglycérolacylhydrolases qui appartiennent à la famille des hydrolases et réagissent spécifiquement sur la liaison ester du groupe carboxyester [4]. Il a été montré que cette lipase présente une bonne activité catalytique [5]. De plus, sa structure tridimensionnelle adopte une conformation particulière qui la rend active en s'adsorbant aux interfaces huile/eau [6, 7]. Cette enzyme produite extra cellulairement par *Candida rugosa* ou *Candida cylindracea*, est largement employée comme catalyseur de diverses réactions (hydrolyse, estérification, transestérification, interestérification) en milieux aqueux ou organiques [8].

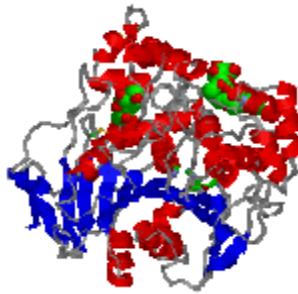


Figure III. 3: Structure tridimensionnelle de la lipase de *Candida rugosa* : en rouge l'hélice α et en bleu les feuilles β [9].

Cette enzyme (Figure 3) consiste en une seule chaîne polypeptidique de 543 acides aminés d'une taille moléculaire de 60 kDa, avec une triade catalytique bien définie Ser209-His449-Glu341. Cette triade est entourée principalement par des acides aminés avec un caractère hydrophobe et enfermée par un couvercle composé d'une hélice α amphiphile. L'activation interfaciale de cette enzyme est atteinte par l'ouverture de ce couvercle au-dessus de son site actif. Il a déjà été montré qu'une interface polaire/non polaire est nécessaire de façon à ouvrir ce couvercle et à permettre que le substrat soit en contact avec le site actif [10]. Ainsi, l'activité de cette lipase augmente avec la concentration d'eau jusqu'à un seuil [11]. Ainsi, travailler en milieu émulsifiée constitue un avantage pour la réalisation de ce type de synthèse. Nous avons utilisé l'enzyme commerciale Lipolyse CC. Il s'agit d'une préparation industrielle de la levure *Candida rugosa* sous forme lyophilisée.

II-2. Partie expérimentale

L'hydrolyse se déroule dans un réacteur de 500 mL constitué d'un bêcher en verre muni une double enveloppe dans lequel circule de l'eau à 37°C. L'agitation mécanique est assurée par un appareil Sylverson L4RT, 25 g d'huile (triglycérides) de *N. lappaceum* obtenu selon la méthode ASE sont pesé directement dans le réacteur et on y ajoute 100 mL d'eau distillée; la température du réacteur est maintenue à 37°C (température de consigne de la lipase), le mélange eau – corps gras est mis sous agitation à 750 tr/min.

La lipase de *Candida Rugosa* est pesée à 1% de la masse de triglycérides et dissoute dans 25 mL d'eau. Après 15 min d'agitation, la solution d'enzyme est ajoutée au milieu. Un premier prélèvement est effectué à un instant (t_0) et la réaction est laissée sous agitation durant 6 heures pour un suivi cinétique. Les premiers prélèvements sont effectués aux deux premières demi-heures. Les autres sont faites toutes les heures. A cet effet, 100 μ L d'échantillon prélevé

sont dissous dans 1 mL de cyclohexane, puis 180 µl de cette solution sont silylés par 20 µl de réactif de silylation (50 µl methyl imidazole dans 1mL de Methyl-trimethylsilyl heptafluorobutyramide).

Après les 6 heures d'hydrolyse, le milieu réactionnel est refroidi à -4°C pendant 2 heures. Il est ensuite réchauffé à 50°C puis centrifugé à 6°C pendant 10 minutes à 10000 tours/min pour séparer la phase organique supérieure (acides gras) et la phase aqueuse (eau, glycérol, lipase). Une filtration sur un tissu en nylon permet de récupérer la phase organique, qui est à nouveau centrifugé pour une élimination maximale d'eau.

Nous avons utilisé de l'huile *N. Lappaceum* obtenu par extraction selon la méthode ASE.

La phase organique obtenu est analysée par la CPG dans les conditions suivantes : colonne CP Sil 8CB low bleed MS de Varian (15 m x 0,32 mm x 0,25 µm) ; le gaz vecteur est l'hélium (15 psi en tête de colonne) ; le four : 55°C pendant 0,5 min, puis 45°C/min jusqu'à 80 °C, ensuite 10 °C/min jusqu'à 360 °C et on reste 360 °C pendant 26 min ; le détecteur FID est fixé 360 °C. L'étalon interne utilisé est l'heptadodécane.

II-3. Résultats

Les profils glycériques et en acides gras de l'huile sont présentés par les figures III.4, III.5 et III.6.

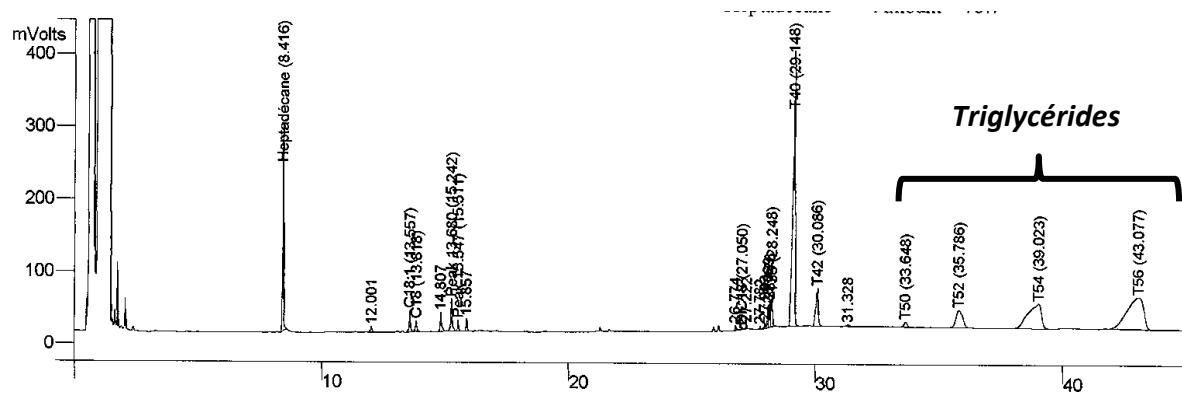


Figure III. 4: Profil glycérique de l'huile de *N. Lappaceum*, obtenu par CPG/FID, colonne CP Sil 8CB low bleed MS de Varian.

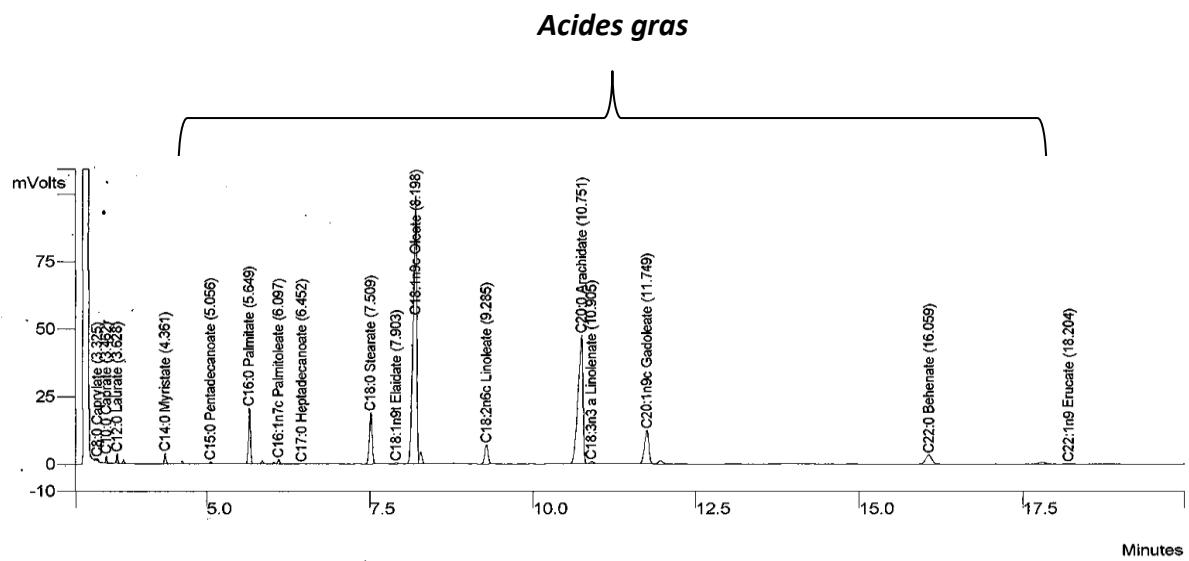


Figure III. 5: Profil en acides gras de l'huile de *N. Lappaceum*, obtenu par CPG/FID colonne CP Sil 8CB low bleed MS de Varian.

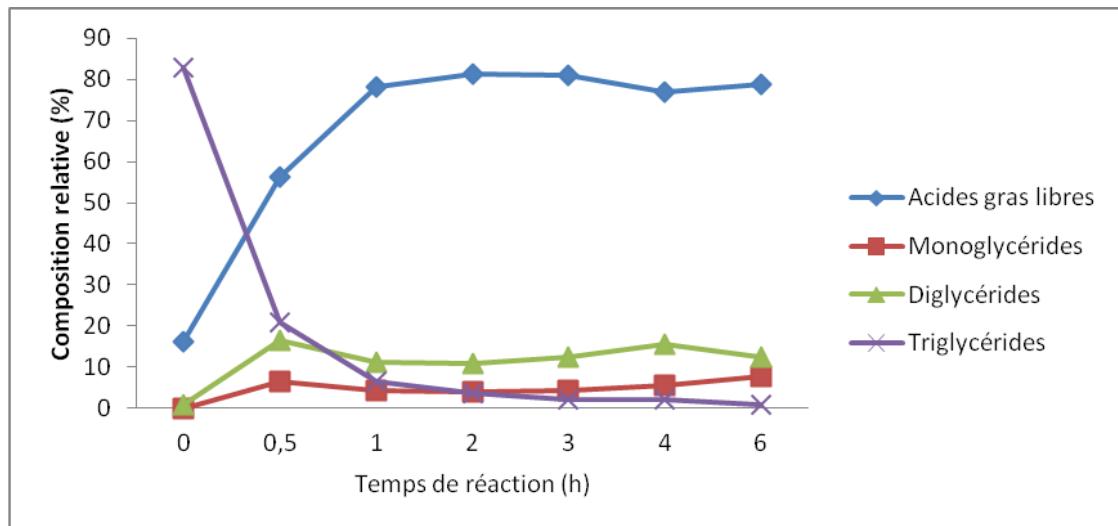


Figure III. 6: Cinétique de l'hydrolyse de l'huile de *N. Lappaceum*.

Les résultats de l'hydrolyse enzymatique de l'huile de *N. Lappaceum* en réacteur en présence de la lipase *Candida rugosa* montrent qu'au bout de 6 h, la teneur en acides gras libres atteint 78,9%. La courbe de cinétique de formation des acides gras montre que l'hydrolyse est complète en 2h. La concentration des intermédiaires de réaction (diglycérides et monoglycérides) demeure faible. La teneur en diglycérides varie entre 16 et 12 %. Des teneurs bien plus faibles en monoglycérides ont été aussi observées (4 à 7%). Des résultats

similaires ont été obtenus par Ibrahim et coll. [12], sur l'hydrolyse de l'huile d'olive et de suif en présence de la lipase de *Candida rugosa*. Les auteurs ont constaté que les di- et monoglycérides se sont retrouvés à de faibles proportions approchant les 10 à 20 %.

La composition relative en acides gras libres du milieu est reportée dans le tableau III.1.

Tableau III. 1: *Composition relative en acides gras de l'huile de N. Lappaceum, composition en acides gras libres de l'huile de N. Lappaceum hydrolysée et composition en acides gras des monoglycérides et diglycérides contenus dans l'huile hydrolysée.*

Acides gras	Huile de N. Lappaceum	Huile de N. Lappaceum Acides Gras Libres 78,9% Rapport AGI/AGS = 1,76 Rapport AGMI/AGS = 1,54	Huile de Hareng (<i>Clupea harengus</i>) [13] Rapport AGI/AGS = 3,69 Rapport AGMI/AGS = 1,54
A. Palmitique (C16:0)	4,9 ± 0,13	8,18	13,3
A. Stearique (C18:0)	6,3 ± 0,26	0,12	1,1
A. Oléique (C18:1n9c)	44,7 ± 0,47	39,94	14,7
A. Linoléique (C18:2n6c)	2,7 ± 0,32	7,65	1,1
A. Arachidique, (A. eicosanoïque) (C20:0)	28,6 ± 0,58	26,63	-
A. Gagoléique (A. 11-eicosénoïque) (C20:1n9c)	8,1 ± 0,22	16,13	17,9
A. Behenique (C22:0)	2,6 ± 0,03	1,34	-
Acides gras	Monoglycérides 7,7% Composition (%)		Diglycérides 12,6% Composition (%)
A. Palmitique (C16:0)	30,840		6,44
A. Stearique (C18:0)	0		0
A. Oléique (C18:1n9c)	21,3		70,54
A. Linoléique (C18:2n6c)	0		0
A. Arachidique, (A. eicosanoïque) (C20:0)	42,76		0
A. Gagoléique (A. 11-eicosénoïque) (C20:1n9c)	1,62		23,02
A. Behenique (C22:0)	3,48		0

Le profil en acides gras obtenus au cours de cette hydrolyse nous présente 2 familles principales d'acides gras:

- les acides gras à chaînes moyennes (l'acide oléique et l'acide linoléique)
- les acides gras à chaînes longues (l'acide arachidique et l'acide gadoléique)

Les acides oléique, arachidique et gadoléique sont les acides gras majeurs du produit d'hydrolyse avec des teneurs respectives et 40%, 27% et 16%. La teneur en monoglycérides est de 7,7% ; celle en diglycérides est de 12,6%.

L'originalité de nos travaux est que l'huile de *N. Lappaceum* hydrolysée est riche en acides gras à longue chaîne saturé (27 % en acide arachidique), et monoinsaturé (16% en acide gadoleique ou 11-eicosénoïque C20 :1). En comparant nos résultats aux données de la littérature, il apparaît que très peu d'espèces, hormis le jojoba, produisent des huiles avec de fortes teneurs en acide arachidique (tableau III.2). De plus, dans le cas du jojoba, il ne s'agit pas de triglycérides mais d'esters d'acides gras et d'alcools gras.

Tableau III. 2 : Comparaison des teneurs en acide arachidique (C20:0) et acide gadoléique (C20 :1) entre l'huile de *N. lappaceum* hydrolysée et les huiles d'autres espèces décrites dans la littérature.

Nom commun	Nom scientifique	Teneur en acide arachidique C20:0 (%)	Teneur en acide gadoléique C20 :1 (%)	Références
Rambutan	Huile de <i>Nephelium lappaceum</i> Linn hydrolysée	28,0	16,13	Nos travaux
	Huile de <i>Nephelium lappaceum</i> Linn	28,6	8,1	Nos travaux
		22,05	-	[14]
		34,32	0,66	[15]
		33,1	7,2	[16]
		36,5	7,2	[17]
		34,5	6,3	[18]
Arachide	<i>Arachis hypoga</i> Linn	1,28	1,2	[14]
Noix de coco	<i>Cocos nucifera</i>	0,04	-	[14]
Palme	<i>Elaeis guineensis</i>	0,23	-	[14]
Tournesol	<i>Helianthus annuus</i> L.	0,15	0-0,2	[14]
Ricin	<i>Ricinus communis</i> L	3,79	-	[14]
Jojoba	<i>Simmondsia chinensis</i>	28,0-31,0	-	[19]
Kusum	<i>Schleicheratriguga</i>	15,79	6,17	[20]

La teneur élevée de l'acide 11-eicosénoïque est observée dans le règne animal, notamment chez les poissons : Hareng 17,9%, morue 19,0%. Cette teneur contribue énormément à éléver le rapport r (monoinsaturé/saturé) = 1,76 dans l'huile de *N. lappaceum* en mieux par rapport à l'huile d'arachide (r = 1,5), l'huile de foie de morue (r = 1,5), l'huile de sardine (r = 1,45) et l'huile d'olive (r = 1,8) [13]. D'après les recommandations de la FAO, l'huile de *N.*

lappaceum présente une composition en acides gras équilibrée en faveur des acides gras monoinsaturés essentiels, elle est fonctionnelle voire bioactive.

De l'analyse des résultats, il découle que les mono et diglycérides résiduaires de la réaction de l'hydrolyse des lipides de réserve sont très intéressants parce que constitués par des acides gras essentiels. Ce sont des molécules bioactives pour lesquelles il contient de favoriser leur production par la voie de synthèse chimique. Ceci est d'autant plus intéressant que l'hydrolyse de l'huile de *N. Lappaceum* conduit à l'obtention d'un milieu organique plus riche en acide gadoléique que l'huile de départ (tableau III.1 et tableau III.2). La différence en composition en acide gadoléique (C20 :1) avant et après hydrolyse est probablement due à la typoselectivité de la catalyse à base de la lipase de *Candida rugosa*. Cet argument renforce cette nécessité de production de molécules riches en acides gras essentiels par synthèse chimique.

III- LES MONOGLYCERIDES, VALEUR AJOUTEE DES ACIDES GRAS EN LIPOCHIMIE

III-1. Etude bibliographique

Synthétisés pour la première fois en 1853, les monoglycérides sont produits industriellement par glycérolise des triglycérides dès 1960. Depuis lors, la synthèse de monoglycérides par la voie chimique a été développée en mettant en jeu différents substrats et réactifs, dont le glycérol et ses dérivés.

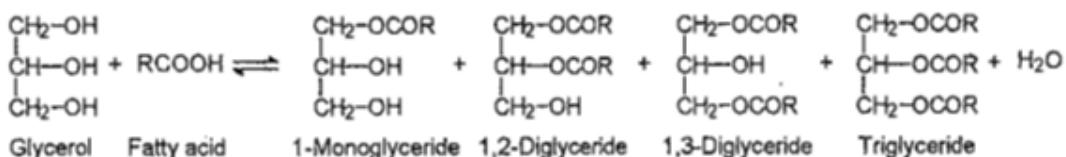
Les procédés de synthèse en corrélation avec un type de réaction donné, permettent d'obtenir des monoglycérides.

On distingue :

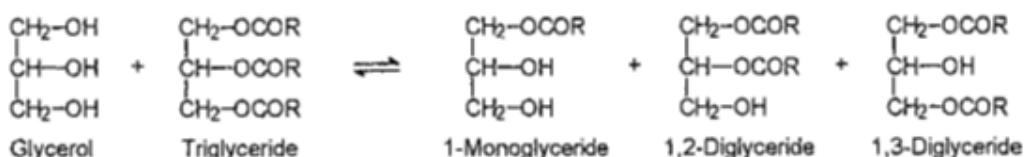
- l'estérification directe des acides gras par le glycérol (équation 1) ;
- la transestérification des triglycérides par le glycérol (réaction de glycérolise (équation 2)) ;
- la transestérification des esters méthyliques d'acides gras par le glycérol (équation 3),
- l'hydrolyse de triglycérides ou d'huile ;

- la condensation des acides gras avec le glycidol ou ses dérivés (équation 5).

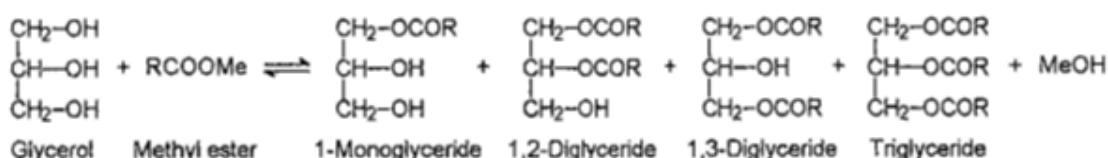
1 - Estérification directe



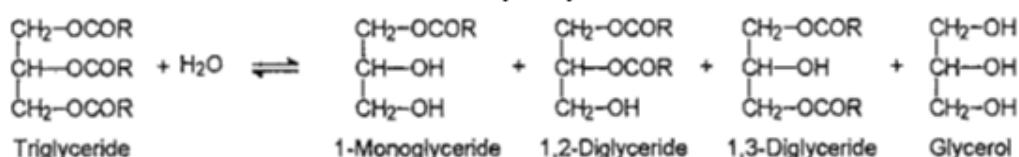
2 - Glycérolyse



3 - Transtérfication



4 - Hydrolyse



5 - Condensation

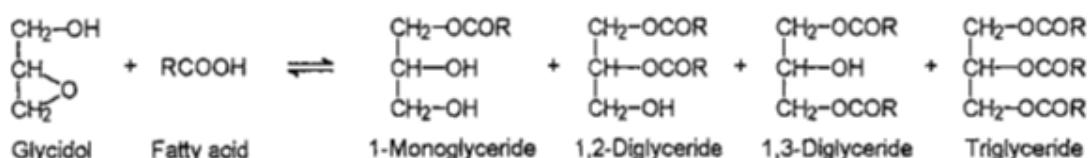


Figure III. 7 : Différentes voies de synthèse des monoglycérides.

L'estérification directe des acides gras et la transestérification des triglycérides par le glycérol sont les deux procédés largement préférés pour la production commerciale de monoglycérides. Ces deux voies conduisent à l'obtention de mélange de mono-, di- et triglycérides. Les α -monoglycérides sont obtenus avec une teneur entre 40 – 55 %. Pour augmenter la pureté de ces monoglycérides, une étape supplémentaire de distillation moléculaire permet d'avoisiner les 90 % en teneur en monoester d'acide gras et de glycérol. Nous avons choisi dans ce travail de mettre en œuvre la réaction d'estérification directe des acides gras par le glycérol.

Le choix de ces méthodes provient du savoir-faire de l'équipe « Réactivité des agromolécules-Lipochimie » du laboratoire de Chimie Agro-Industrielle de l'ENSIACET de Toulouse. L'équipe maîtrise la synthèse de monoglycérides par estérification des acides gras par le glycérol [2, 21]. Cette réaction est mise en œuvre en réacteur « batch » et en réacteur continu. La mise en contact des réactifs est favorisée par leur mise en émulsion par le catalyseur acide qui joue à la fois le rôle de catalyseur et d'émulsifiant. Un tamis moléculaire permet de déplacer l'équilibre de la réaction par piégeage de l'eau formée.

Dans ce travail, le choix de travailler avec des acides gras natifs issus de l'huile de *N. lappaceum* contenant une haute teneur en acides gras à longues chaînes riches en C20:0 et C20:1 a été fait. L'objectif est la synthèse de monoglycérides purs avec de hautes teneurs en monoglycérides en C20:0 et C20:1 afin d'en étudier les propriétés physico-chimiques et physiques.

III-2. Réaction d'estérification du glycérol par les acides gras de *N. Lappaceum*

III-2.1. Généralités

La voie de synthèse choisie est la réaction d'estéification des acides gras avec le glycérol, réalisée sans tiers solvant, en présence d'un catalyseur acide, l'acide dodécylbenzène sulfonique.

Les réactifs en présence sont non-toxiques. La réaction est réversible. Elle conduit à la formation d'eau et de produits glycéridiques (figure III.8).

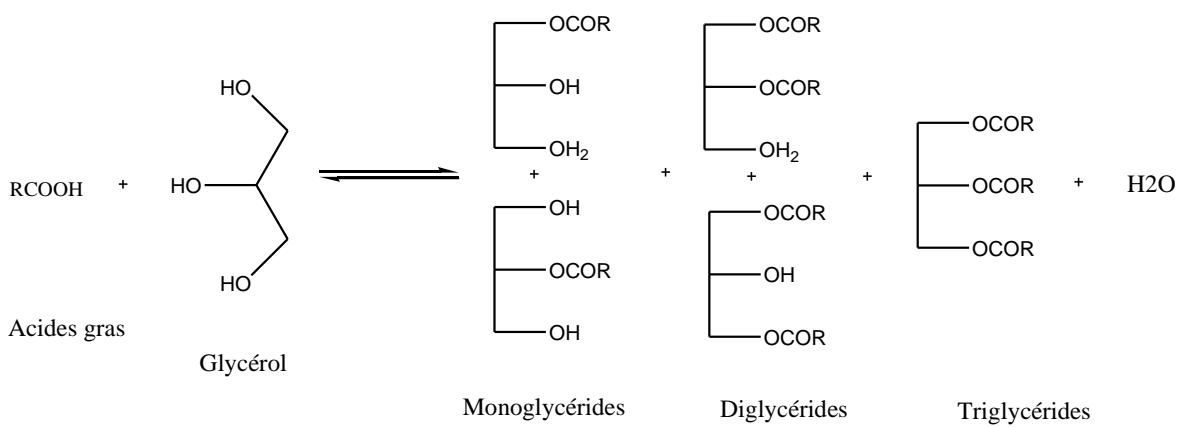


Figure III. 8: Réaction d'estérification d'acides gras avec le glycérol.

Le contrôle du rapport molaire des réactifs conditionne le rendement et la sélectivité de la réaction.

Les acides gras et le glycérol sont immiscibles. Dans ces conditions, l'utilisation de catalyseurs possédant des propriétés d'agent émulsifiant, comme le DBSA, qui favorise à la fois la catalyse acide et la mise en contact des réactifs, est une solution efficace [2].

III-2.2. Protocole opératoire

Le mélange réactionnel est placé dans un réacteur de 250 mL muni d'un agitateur mécanique ; le réacteur est relié à une pompe péristaltique qui communique avec un réacteur colonne (hauteur = 240 mm, diamètre interne = 25 mm) en inox à double enveloppe (figure III.9) [2].

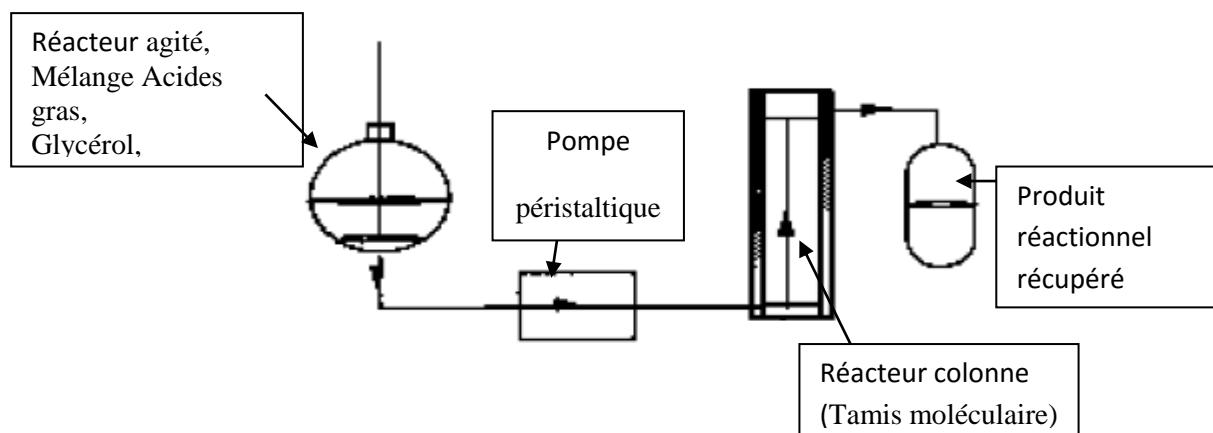


Figure III. 9: Schéma du montage réactionnel.

Les acides gras proviennent de l'hydrolyse de l'huile N. Lappaceum, le glycérol (99,9% pur) de chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'acide dodécylbénzène sulfonique (DBSA) de chez ACROS et le tamis moléculaire de type 3A extrudé de chez Prolabo - Subra. Les réactifs sont introduits dans le réacteur agité dans les proportions suivantes : 0,2 mol. d'acides gras (AG), 0,4 mol glycérol (Gly) et 0,025 mol d'acide dodécylbénzènesulfonique (DBSA). La température est maintenue à 120°C. Le mélange est agité à l'aide d'un ultraturax (vitesse d'agitation en position 5). Une microémulsion monophasique est ainsi obtenue. La pompe péristaltique est mise en action de façon à ce que le temps de résidence des réactifs dans le réacteur colonne (120°C) soit de 45 min et que la durée totale de la réaction de 1h. Afin de vider entièrement le réacteur colonne, le milieu réactionnel est poussé avec du

glycérol. Le milieu est récupéré et lavé avec une solution saturée de NaCl (3 fois 100 mL) dans une ampoule à décanter pour éliminer le glycérol en excès.

III-2.3. Cinétique d'estérification

Les résultats de la cinétique de l'estérification des acides gras de *N. lappaceum* avec le glycérol, présentés sur la figure III.10, montrent que le maximum de conversion des acides gras (80%) est atteint très rapidement en 20 min, avant le passage dans le réacteur colonne contenant le tamis moléculaire 3A.

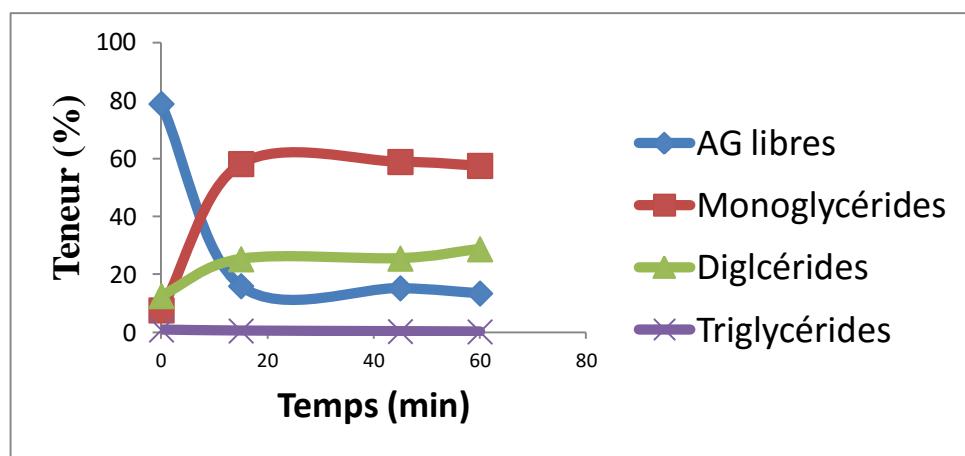


Figure III. 10 : Cinétique de la réaction d'estérification des acides gras de *N. Lappaceum* avec le glycerol.

Le profil chromatographique est donné sur la figure III.11.

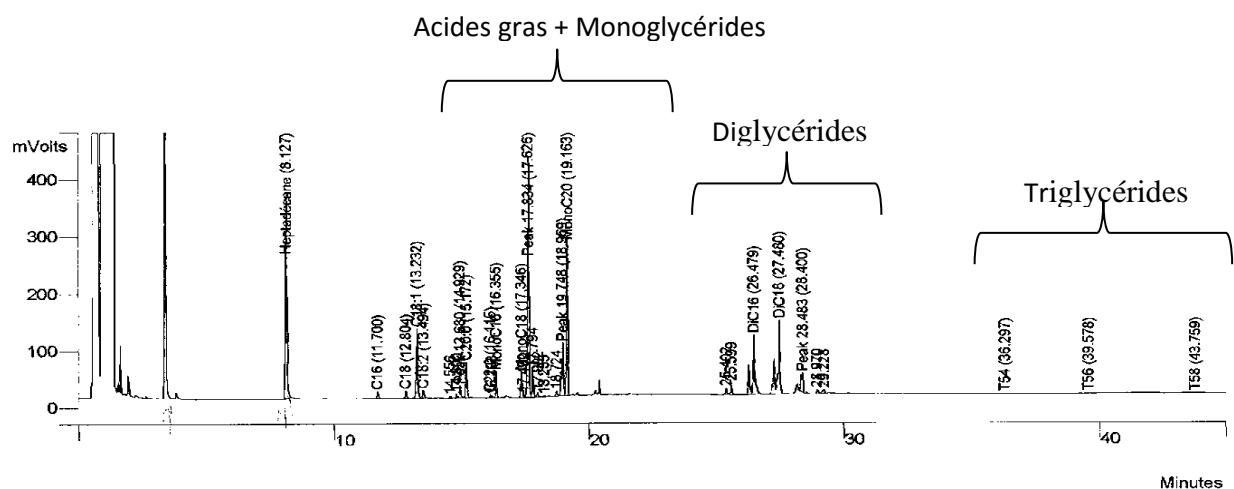


Figure III. 11: Profil glycéridique de fin de réaction d'estérification des acides gras de *N. Lappaceum* avec le glycérol.

La composition en monoglycérides, diglycérides et triglycérides est alors constante et maximale (tableau III.3).

Tableau III. 3 : Composition relative en % du milieu réactionnel de l'estérification des acides gras de *N. Lappaceum* avec le glycérol.

	Composition relative (%) du milieu			
	TG	DG	MG	AG
Prélèvement temps initial	0,8	12,6	7,7	78,9
Prélèvement 15 min	0,55	25,3	58,2	16,0
Prélèvement 45 min	0,34	25,5	58,9	15,3
Prélèvement 60 min	0,24	28,8	57,5	13,5

La réaction se déroule principalement dans le réacteur agité et conduit à un rendement en monoglycéride supérieur au rendement décrit dans la littérature par Eychenne et coll. [2]. Ceci est probablement lié à la qualité des microémulsions observées durant la réaction. Tout au long de l'expérience, nous avons observé qu'une fois la température de réaction atteinte, le milieu réactionnel est devenu homogène monophasique, alors que les constituants en présence, glycérol et acides gras sont immiscibles. Ceci est dû à l'action conjuguée du catalyseur tensioactif DBSA, des tensioactifs générés *in situ* et à la température. Ce système réactionnel microémulsionné se comporte ainsi comme un système monophasique qui permet une mise en contact optimale des réactifs. Les phénomènes de diffusion deviennent non limitant. Le transfert de matière est favorisé. L'eau formée au cours de l'estérification participe à ce système microémulsionné et semble être « compartimenté » et isolé des réactifs. Cela entraîne alors un déplacement de l'équilibre favorisant la production de monoglycérides. La composition en monoglycérides est donnée dans le tableau II.4.

Nous remarquons que la proportion en monooléate de glycérol est de 45% et celle en monoarachidate de glycérol de 26%, valeurs qui sont très proches de la composition en acides gras correspondants de départ.

Tableau III. 4: *Composition relative (%) en monoglycérides du milieu réactionnel de l'estérification des acides gras de N. Lappaceum avec le glycérol.*

Temps de retention (min)	Monoglycérides	Composition relative (%) en monoglycérides
16,74	C16:0	4,3
17,34	C18:2	4,6
17,62	C18:1	44,9
17,79	C18:0	4,9
18,96	C20:1	12,2
19,16	C20:0	26,4
20,41	C22:0	2,7

La teneur en monoglycéride C20 :1 est légèrement inférieure à celle de départ. Elle passe de 16% à 12,2%. Il est possible que cette différence soit causée par une réactivité légèrement plus élevée de l'acide gadoléique, acide gras monoinsaturé qui pourrait se retrouver sous forme de di- et triglycérides en proportion supérieure. La quantification de la teneur en acides gras dans les triglycérides formés n'a pas été réalisée. La teneur en C20 :1 dans les monoglycérides est toutefois élevée et digne d'intérêt pour l'évaluation des propriétés physico-chimiques. La présence de ces composés a été confirmée en CPG-SM, dont les spectres de masse sont consignés en annexes.

III- ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES DES MONOGLYCERIDES DE N. LAPPACEUM

La plupart des composés à longues chaînes hydrocarbonées présentent des formes cristallines polymorphes qui peuvent varier en fonction de leur nature chimique, de leur environnement et des conditions de solidification. La notion de polymorphisme indique la possibilité qu'une substance puisse cristalliser sous différentes formes cristallines pouvant être plus ou moins stables.

IV-1. Monoglycérides et paramètres de formulation

Les monoglycérides sont des esters d'acides gras et de glycérol. Les monoglycérides constituent 75 % du total des émulsifiants alimentaires. Ce sont des agents de surface (tensioactif ou surfactifs) composés d'une partie à caractère hydrophobe et d'une partie polaire à caractère hydroophile (figure III.12).

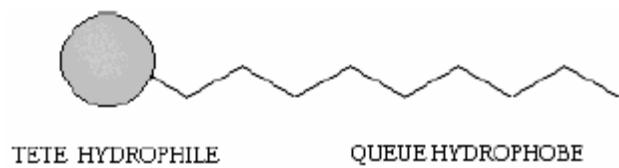


Figure III. 12 : Schéma simplifié d'une molécule amphiphile.

Les surfactifs sont des substances dont la molécule possède à la fois un groupe polaire et un groupe apolaire. Le groupe polaire est un groupe fonctionnel qui comporte des hétéroatomes d'oxygène.

Ce sont ces hétéroatomes qui produisent une forte interaction avec les solvants polaires, particulièrement l'eau. En ce qui concerne le groupe apolaire, il s'agit ici d'une chaîne hydrocarbonée ancrée directement sur le groupe polaire. C'est la dualité polaire-apolaire qui confère aux surfactifs le caractère amphiphile. Ce terme a été introduit par Winsor [22] à partir des racines "amphi" et "philos" et signifie textuellement "qui possède une affinité de deux côtés", c'est-à-dire, vis à vis des substances polaires et apolaires. La plupart des amphiphiles sont surfactifs parce qu'ils se localisent de préférence à la surface ou à l'interface. La figure III.13 montre la position par laquelle la molécule amphiphile peut satisfaire sa double affinité.

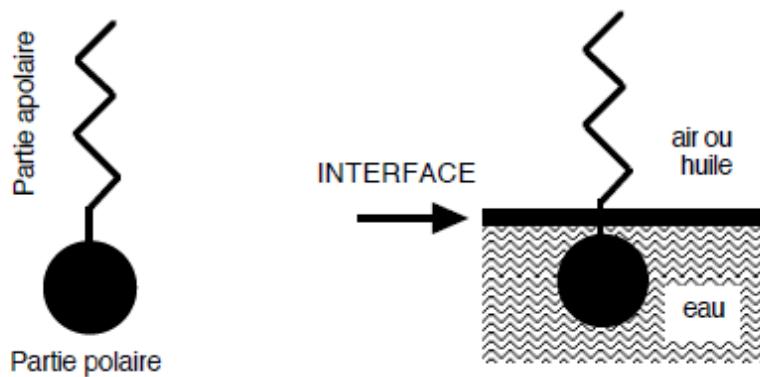


Figure III. 13: Modèle d'une molécule de surfactif et son placement à l'interface.

La formulation des systèmes eau/huile/tensioactif a suscité de nombreuses études au cours du vingtième siècle. Bancroft, en 1913, énonce une règle empirique selon laquelle la phase continue de l'émulsion est celle où le tensioactif est le plus soluble. Il dit spécifiquement que si la tension de surface entre le liquide A et l'agent émulsifiant est plus faible que la tension de surface entre le liquide B et l'agent émulsifiant, le liquide A sera le dispersant et le liquide B la phase dispersée. En 1949, Griffin [23, 24] propose la notion de balance hydrophile-lipophile (ou méthode HLB, de l'anglais Hydrophilic-Lipophilic Balance). C'est la première méthode numérique qui permet de quantifier l'affinité du tensioactif pour les phases aqueuses et huileuses.

Des valeurs de $HLB = 1$ et $HLB = 20$ ont été arbitrairement attribuées à l'acide oléique et à l'oléate de potassium, respectivement. La méthode consiste à déterminer un nombre HLB au tensioactif en accord avec une échelle. Cette valeur de HLB dépend essentiellement du tensioactif et ne prend pas en compte les autres variables de formulation physico-chimique. Pour calculer les valeurs de HBL des tensioactifs non ioniques, Griffin propose la relation suivante :

$$HBL = \left(\frac{H}{H + L} \right) \times 20$$

Avec H = masse moléculaire de la partie hydrophile. L = masse moléculaire de la partie hydrophobe.

Une autre méthode empirique de calcul de HLB a été proposée par Davies [25]. Dans cette méthode, on attribue à chaque motif constituant le tensioactif, un nombre caractérisant son hydrophilie. Le HLB est alors donné par la formule suivante :

$HLB = 7 + \Sigma$ des nombres des groupes hydrophiles - Σ des nombres des groupes hydrophobes. Les propriétés et les applications sont classées en fonction des valeurs de HLB comme le montre le tableau III.5[26].

Tableau III. 5: Applications des tensioactifs en fonction de la HLB.

HLB	Applications
1,5 - 3	Anti-mousse
3 - 6	Emulsifiant (eau/huile)
7 - 9	Agent mouillant
8 - 18	Emulsifiant (huile/eau)

13 - 16	Détergent
15 - 18	Solubilisant

Dans nos travaux, nous nous sommes intéressés aux calculs des valeurs du HLB des acides gras majoritaires et des monoglycérides correspondants. Ces résultats sont consignés dans le Tableau III.6.

Tableau III. 6 : HLB calculé d'après la méthode de Davies [25].

Composés	HLB
Acide oléique (C18:1)	1
Acide arachidique (C20:0)	<1
Acide eicosénoïque (C20:1)	<1
Monoglycéride - C18:1	3,4
Monoglycéride - C20:0	2,8
Monoglycéride - C20 :1	2,8

Ces calculs montrent que les acides gras et monoglycérides obtenus à partie de l'huile de *N. Lappaceum* présentent des valeurs de HLB faibles, leur domaine d'utilisation concerne les anti-mousses et les agents émulsifiants eau dans huile. Toutefois, cette méthode de calcul très empirique ne permet pas de différencier et de mettre en évidence les différentes propriétés physico-chimiques de molécules étudiées.

IV-Coefficient de partage

Le coefficient de partage octanol/eau, appelé LogP ou Kow, est une mesure de la solubilité différentielle de composés chimiques dans deux solvants. LogP est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau. $\text{LogP} = \text{Log}(\text{Coct/Ceau})$. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule. En effet, si LogP est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau ; ce qui reflète son caractère lipophile, et inversement. Une valeur de LogP = 0 signifie que la molécule est aussi soluble aussi dans un solvant que dans l'autre.

Nous avons déterminé les coefficients de partage n-octanol/ eau des acides gras et des α -monoglycérides correspondants et majoritaires dans l'huile de *N. Lappaceum*. La méthode utilisée est une « QSAR » réalisée grâce au logiciel HyperchemTM version.7.01 (tableau III.7).

Tableau III. 7 : Coefficients de partage eau/octanol.

Composés	logP
Acide oléique	6,14
Acide arachidique	7,2
Acide eicosénoïque	6,94
Monooléate de glycérol	5,36
Monoarachidate de glycérol	6,41
Monoeicosénoate de glycérol	6,15

En comparant les valeurs de logP de acides gras (tableau III.7), l'acide oléique, l'acide arachidique et l'acide eicosénoïque, à celle des monoglycérides correspondants, à savoir le monooléate de glycérol, le monoarachidate de glycérol et le monoeicosénoate de glycérol, il apparaît clairement que l'insertion d'un acide gras en position 1 du glycérol conduit à la formation d'un monoglycéride qui possèdent un logP plus faible. L'affinité du monoglycéride pour les solvants polaires est supérieure à celle de l'acide gras correspondant. Contrairement au HLB, le logP est un paramètre qui permet significativement de différencier des molécules aux caractéristiques proches. Les monoglycérides et acides gras qui sont des molécules hydrophobes avec des longueurs de chaîne alkyles proches peuvent être discriminés et ainsi classé par ce paramètre logP. Ceci est primordial d'un point de vue des applications visées. C'est un paramètre déterminant en formulation d'émulsions contenant des principes actifs par exemple.

V- CARACTÉRISATIONS ET PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

Les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques utilisent largement les glycérides en mélanges et exploitent leur polymorphisme afin de protéger ou de libérer des principes actifs de natures diverses [27, 28] . Par conséquent, une description des différentes structures formées en fonction du temps et des variations de température ainsi qu'une compréhension plus générale des comportements thermiques et structurels des mélanges de glycérides est

nécessaire. Il convient de rappeler que les glycérides sont des molécules naturellement abondantes utilisées pour le stockage de l'énergie ainsi que pour construire des molécules dans les systèmes vivants. Le mono-, di-, triglycérides sont naturellement en mélanges qui résultent de l'action des lipases endogènes, action de grande importance biologique. Par conséquent, les mélanges solides obtenus avec un acide gras à longue chaîne tel l'acide arachidique sont des candidats particulièrement intéressants, notamment pour la protection et la libération contrôlées de molécules d'intérêt. La quantité de monoglycérides qui sont des molécules lyotropes doit souvent être ajustée dans les mélanges GRAS (Generally Recognized As Safe) pour obtenir l'effet attendu. L'étude de la cristallisation de glycérides a fait l'objet d'une abondante littérature qui a permis d'exploiter une grande variété d'outils expérimentaux [29-33]. Une telle abondance de sources est liée à la large gamme de glycérides obtenus à partir d'acides saturés ou insaturés, les acides à chaîne courte ou longue, ou même au nombre de carbones pair ou impair des chaînes alkyles.

Le polymorphisme des monoglycérides est dû aux nombreuses possibilités d'empilement des chaînes latérales des acides gras. Différentes formes d'organisation correspondant chacune à un arrangement particulier des chaînes latérales, coexistent. La plus stable est la forme β . Elle peut être déterminée en chauffant l'échantillon ; la température caractéristique de sa mise en évidence correspond à la température de fusion de l'échantillon. Enfin, la conséquence de la diversité des structures possibles formées est que des mélanges de glycérides peuvent présenter un comportement complexe et polymorphe vis-à-vis de la température ou du temps. Ce comportement reste encore inconnu.

Dans ce travail, l'étude physico-chimique du polymorphisme des mélanges d'acides gras et des monoglycérides riches en acide gras à longue chaîne (acide arachidique et acide 11-eicosénoïque) a été menée par microscopie optique à polarisation croisée et par analyse enthalpique différentielle (DSC).

V-1. Matériels et méthodes

V-1.1. Microscopie optique

Les observations ont été réalisées avec un microscope optique Nikon Eclipse E600 (Nikon Corporation, Japon) équipé de filtres polarisés et muni d'une platine chauffante Mettler

Toledo FP82HT géré par une unité centrale FP90. Les images ont été acquises par une caméra couleur haute résolution à faible bruit CCD Nikon DXM-1200 et analysées en utilisant le logiciel LUCIA G version 4,8. Les points de fusion des échantillons ont été déterminés en utilisant le programme de chauffage suivant : Chauffage de 30 °C à 80 °C à 5 °C/min. Des clichés sont réalisés toutes les 24 secondes, soit une image par degré.

V-1.2. Analyse enthalpique différentielle

Les points de fusion sont mesurés avec appareil DSC Pyris 1 (Perkin Elmer, USA), équipé d'un système de refroidissement IntraCooler. Le gaz de purge est de l'azote à un débit de 20 mL/min. L'Indium ($T_f = 156,6$ °C) et de l'eau distillée ($T_f = 0$ °C) sont utilisés pour l'étalonnage de la température. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Pyris (Perkin Elmer). Des capsules en acier inoxydable équipés de joints toriques sont utilisées.

L'analyse enthalpique différentielle permet la mesure des variations d'énergie thermique fournies à l'échantillon à analyser, par rapport à un creuset vide appelé référence. Il est donc nécessaire de disposer de deux creusets identiques régulés en température, contenant l'échantillon à analyser et le témoin. L'échantillon est placé dans un dispositif dont le principe est schématisé sur la figure III.14 :

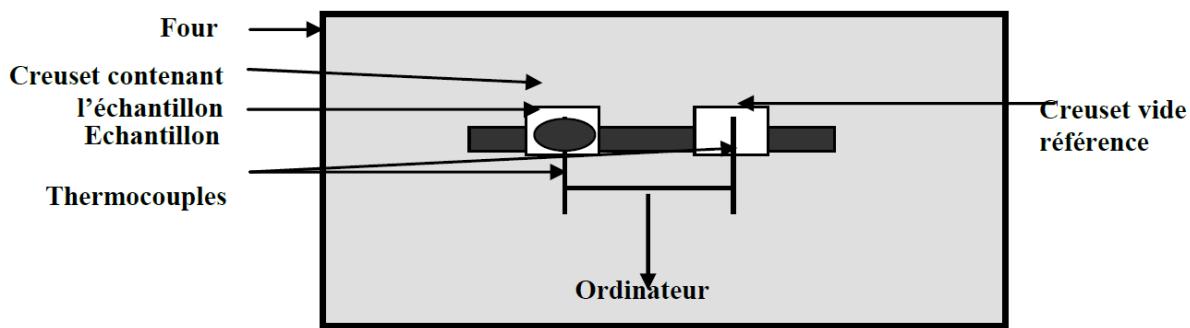


Figure III. 14: Principe de mesure par analyse enthalpique différentielle.

Les deux récipients se trouvent dans un four à température réglée grâce à un thermocouple relié à un ordinateur et contrôlé par logiciel. La différence entre la température de l'échantillon et celle de la référence, est convertie en flux de chaleur. Dans ce cas, les flux de

chaleur transmis à l'échantillon et au récipient de référence sont identiques. L'échantillon représente de la matière supplémentaire dans le récipient témoin par rapport au récipient de référence. La présence de cette matière supplémentaire et son "inertie thermique" (plus il y a de matière, plus il faut de temps pour que l'équilibre thermique se fasse) font que le récipient témoin ne sera pas à la même température que le récipient de référence. Le résultat de la mesure DSC est donc la quantité de chaleur (variations d'enthalpie (ΔH)) supplémentaire à fournir au récipient témoin.

La programmation de la température est la suivante : de +25 à -50 °C à raison de 20 °C/min. Isotherme à -50 °C pendant 5min ; puis chauffage de -50 °C à 80°C à raison de 20 °C/min.

V-1.3. Détermination des points de fusion

Les températures de fusion des composés ont été déterminées par DSC et par microscopie optique en utilisant une platine chauffante.

En DSC, la température de fusion correspond à la température à laquelle le pic endothermique de fusion est maximal.

En microscopie, la température de fusion correspond à la température à laquelle le produit observé entre le porte-lame et la lamelle d'observation a totalement fondu.

V-1.4. Méthode de séparation et purification par chromatographie flash

Afin de disposer d'échantillon de haute pureté en monoglycérides et diglycérides, le milieu réactionnel obtenu par estérification des acides gras de *N. lappaceum* a été purifié par chromatographie flash (Combiflashretrieve, serlabo, Entraigues sur la Sorgue, France). Deux grammes du mélange sont déposés sur une cartouche de 12 g de silice (diamètre du mm, 200mm de haut). L'élution est réalisée avec de l'éther diéthylique au débit de 6 mL/min. Les fractions de 3 mL sont récupérées en sortie du système dans des tubes et le solvant est évaporé. Les fractions de même nature sont rassemblées et conservé à l'abri de la lumière. Le DBSA très polaire, donc n'est pas élué et reste en tête de colonne, Il est entraîné en fin d'analyse par élution avec d'éthanol. La pureté des produits a été vérifiée par GPG. Les résultats sont présentés dans le tableau III.8.

V-2. Résultats et discussion

Les compositions de 3 fractions purifiées par chromatographie flash sont reportées dans le tableau III.8. Ce tableau donne la composition en acides gras libres, en monoglycérides, en diglycérides et triglycérides. La fraction diglycérides éluée contient 92% de diglycérides et 6,8% d'acides gras. Deux fractions de monoglycérides obtenues l'état pur (100% de monoglycérides) présentent des compositions différentes.

La température de fusion est une des plus importantes propriétés physiques d'une substance. Elle joue un rôle majeur dans la détermination de la pertinence et l'applicabilité d'une substance dans des domaines alimentaires et non alimentaires innombrables.

Tableau III. 8: Pourcentages molaires des fractions mono et di-glycérides après purification par chromatographie flash.

	Fraction diglycérides (% molaires)	Fraction monoglycéride (% molaires)	
Acides Gras libres	6,8	0,0	0,0
C16:0	0,2	0,0	0,0
C18:2n6c	2,5	0,0	0,0
C18:1n9c	2,0	0,0	0,0
C18:0	0,4	0,0	0,0
C20:1n9c	0,5	0,0	0,0
C20:0	1,2	0,0	0,0
C22:0	0,0	0,0	0,0
Monoglycérides	0,0	100,0	100,0
C16:0	0,0	8,1	5,34
C18:2n6c	0,0	3,2	5,1
C18:1n9c	0,0	34,5	47,2
C18:0	0,0	0,89	5,2
C20:1n9c	0,0	6,6	10,9
C20:0	0,0	46,7	26,3
C22:0	0,0	0,0	0,0
Diglycérides	92,6	0,0	0,0
C16:0	37,4	0,0	0,0
C18:2n6c	0,0	0,0	0,0
C18:1n9c	45,7	0,0	0,0
C18:0	0,0	0,0	0,0
C20:1n9c	0,0	0,0	0,0
C20:0	9,5	0,0	0,0
C22:0	0,0	0,0	0,0
Triglycérides	0,6	0,0	0,0

De nombreux éléments structuraux influencent la température de fusion d'un composé organique. Il s'agit notamment de : la masse moléculaire, le nombre et la configuration des doubles liaisons, la ramification, la stéréochimie, la présence d'un ou plusieurs groupes polaires tels que les fonctions hydroxyles.

Les températures de fusion obtenues en fonction des différentes transformations et des caractéristiques des échantillons sont comparées à certains valeurs trouvées dans la littérature [34] (tableau III.9).

Tableau III. 9: Caractéristiques et propriétés physiques des différents échantillons.

Echantillons	T° fusion (°C)	% C18:1	% C20:0	% C20 :1
Huile <i>N. lapaceum</i> (triglycérides)	20	39,9	26,6	8,1
Acide gras <i>N. lapaceum</i> 98,9%	63	39,6	28,3	16,13
Acide oléique *	16	100,0	0,0	0,0
Acide arachidique *	75	0,0	100,0	0,0
Acide eicosénoïque *	23	0,0	0	100
Monoglycéride 100%	56	34,4	46,7	6,6
Monoglycéride 100%	51	47,2	26,3	10,9
Monooléate de glycérol 100% *	35	100,0	0,0	
Monoarachidate de glycérol 100% *	84	0,0	100,0	
Diglycéride 92,6%	65	45,7	9,5	
Reconstitution du mélange d'acides gras	28	39,6	28,3	
Reconstitution du mélange de monoglycérides 1	51	34,4	46,7	
Reconstitution du mélange de monoglycérides 2	39	47,2	26,3	

(*) : Valeurs selon A. Thomas [34].

Le point de fusion de l'huile de *N. lappaceum* est de 20 °C. Son hydrolyse conduit à l'obtention d'un mélange d'acides gras présentant une température de fusion très élevée de 63°C. Le procédé de synthèse par estérification permet l'obtention de mélanges d' α -monoglycérides de haute pureté, riches en monoarachidate de glycérol et monooléate de glycérol. Nous avons alors montré, par purification des différentes fractions contenues dans le mélange réactionnel, que la composition en monoglycérides est un paramètre très important qui influence la température de fusion. Deux fractions pures à 100 % en monoglycérides, mais contenant des proportions différentes en monoglycérides (Tableau III.8) possèdent des

températures de fusion différentes. Celle contenant le plus de monoarachidate de glycérol présente le point de fusion le plus élevé (56 °C). En calculant le point de fusion d'un mélange de monoglycérides en pondérant les températures de fusion par rapport à la composition théorique du mélange (températures de fusion du MG-C18 :1 et MG-C20 :0, la température de fusion du MG-C20 :1 étant indisponible dans la littérature) nous retrouvons les résultats expérimentaux. Ces résultats ont été obtenus pour les mélanges de « monoglycérides 100% ». Ainsi la « reconstitution du mélange de monoglycérides 1 » conduit à une température de fusion de 51°C très proches des 56°C obtenus expérimentalement, et la « reconstitution du mélange de monoglycérides 2 » conduit à une température de fusion de 39°C également proche de 51°C déterminés expérimentalement. Les différences peuvent être dues au fait que les propriétés physiques de ces molécules ne sont pas additives et également au fait que le MG-C20:1 n'est pas pris en compte et joue probablement une influence notable.

Le phénomène est totalement différent en ce qui concerne les acides gras. En effet, si l'on effectue le même type de calcul, on trouve des valeurs de température de fusion très éloignées des résultats expérimentaux : 28 °C calculé contre 63 °C mesurés pour le mélange d'acides gras pur à 98 %. Dans ce cas, l'organisation des acides gras est telle que l'acide gras possédant le point de fusion le plus élevé, alors qu'il n'est pas majoritaire dans le mélange (28,3 % pour l'acide arachidique, $T_f = 75$ °C) stabilise physiquement les acides gras de point de fusion moins élevé tels que l'acide oléique (39,6% dans le mélange, $T_f = 16$ °C) et l'acide eicosénique (16,3 % dans le mélange, $T_f = 30$ °C).

On remarque que l'échantillon riche en diglycérides possède une température de fusion très proche du mélange riche en acides gras.

Il est reporté dans la littérature [35] que les températures de fusion des mono- et di-glycérides qui sont produits à partir des graisses sont en général supérieures de 10 à 20 °C à celle de la source d'huile. Les points de fusion augmentent dans l'ordre tri-, di-, monoglycérides. Ceci n'est valable que pour une même chaîne hydrocarbonée de monoglycérides. En effet, dans notre étude, il s'agit de mélanges de tri-, di-, monoglycérides constitués d'acides gras saturés (acide arachidique) et insaturés (acide oléique et acide eicosénique). Ceci rend difficile la compréhension de phénomènes physiques. Le tableau III.9 montre clairement l'ordre croissant suivant des températures de fusion : triglycérides < monoglycérides < diglycérides < acides gras. La différence des températures de fusion entre la source d'huile (considérée comme mélange de triglycérides) est très élevée (de l'ordre de 30 °C) et supérieure aux tendances décrites dans la littérature [35].

V-3. Etude du polymorphisme

Graisses et les lipides sont employés dans les denrées alimentaires, cosmétiques, produits pharmaceutiques, etc... comme la base principale des produits finis, ou en tant que matrices dans lesquelles les produits cosmétiques, pharmaceutiques et autres produits chimiques sont dispersés [28]. Les acides gras, et glycérides sont des espèces moléculaires constituantes des graisses et des lipides qui sont classées en tant que composés à longue chaîne [36]. La cristallisation des graisses et des lipides entraîne des implications industrielles d'importance. Par exemple le traitement des produits finis constitués de cristaux de matières grasses, comme le chocolat, la margarine la crème à fouetter, etc., la séparation des matières grasses spécifiques provenant des ressources naturelles. Pour diverses utilisations, il ya une nécessité croissante de développement de technologies permettant l'obtention de graisses de haute et de basse température de fusion. L'objectif est d'éviter la production de produits *trans* issus de l'hydrogénéation, ce qui permet de faire face aux nouvelles normes réglementaires mais également de maintenir une meilleure fonctionnalité par rapport aux produits conventionnels [37]. Si l'utilisation d'huiles issues du règne animal comme les huiles de poisson est recommandée grâce à la teneur élevée en acides gras monoinsaturés essentiels, la production d'huiles végétales riches en acides gras monoinsaturés potentiellement plus stables physiquement et chimiquement par la faible teneur en acides polyinsaturés est une voie originale et intéressante.

Il n'existe aucun composé à longue chaîne qui n'est pas polymorphe ; et cette propriété est plus étendue dans les graisses et les lipides. Par exemple, un triacylglycérol (TAG), un ester d'acide gras de glycérol, possède généralement trois polymorphes. Le comportement de cristallisation du TAG comme la vitesse de cristallisation, la taille de cristaux et de leur réseau, la morphologie des cristaux et la cristallinité sont directement influencés par le polymorphisme qui dépend de la structure moléculaire elle-même, et par plusieurs facteurs externes comme la température, la pression, le solvant, la vitesse de cristallisation, les impuretés, etc....

La fusion et la cristallisation diffèrent d'un polymorphe à l'autre puisque chaque structure cristalline possède une énergie libre de Gibbs différente [38, 39]. La cristallisation et la transformation des triglycérides polymorphes sont en premier lieu déterminées par la stabilité thermodynamique, exprimée par l'énergie libre de Gibbs (*G*) en fonction de la température. Il

en résulte que les formes polymorphes avec une valeur élevée de G ont une grande solubilité et de faibles points de fusion. Il y a deux types de polymorphisme chez les glycérides : énantiotope et monotrope. Dans plusieurs des cas, le polymorphisme des triglycérides est monotrope, c'est-à-dire que certaines variétés cristallines sont métastables par rapport à d'autres, comme le montre à la figure III.15.

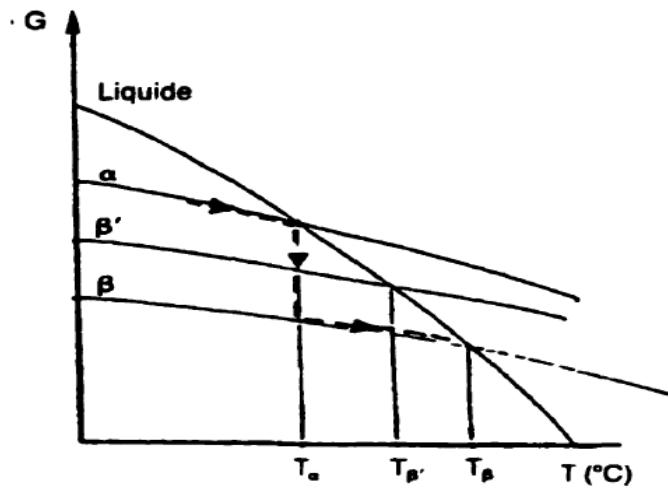
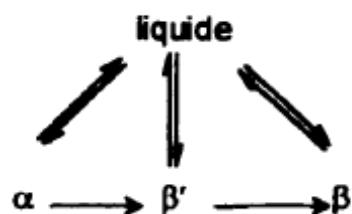


Figure III. 15: Diagramme représentant le monotropisme en terme de variations d'enthalpies libres des trois variétés polymorphes α , β' et β (et) du liquide dont les températures de fusion sont T_α , $T_{\beta'}$ et T_β [40].

Ainsi chaque polymorphe montre un unique point de fusion. Les aspects critiques de la cristallisation à la transformation sont influencés par ces conditions thermodynamiques. A cause de sa nature monotrope, la transformation polymorphe de la forme la moins stable vers la plus stable est irréversible en fonction du temps et de la température.

Les transformations qui s'effectuent de la forme métastable α vers la forme instable β' puis vers la forme thermodynamiquement stable β sont irréversibles [41, 42]. Les transitions de phase d'un triglycéride simple peuvent être décrites par le schéma suivant :



La barrière d'énergie de transformation des triglycérides est relativement faible et les transitions se produisent dans toutes les phases.

L'existence de polymorphisme complexe résulte directement des différentes possibilités d'empilement des chaînes hydrocarbonées. Dans leur état de plus basse énergie, ces dernières sont en forme de zigzag planaire, tous les groupements étant en position *trans* les uns par rapport aux autres. Les interactions entre chaînes qui résultent des forces de dispersion s'exerçant à petite distance provoquent leur empilement parallèle qui résulte, au niveau du cristal, en la formation de strates. Les modes d'empilements parallèles sont multiples, ce qui est à l'origine du polymorphisme des lipides.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude calorimétrique des systèmes réactionnels issus de la transformation de l'huile de *N. Lappaceum*. La figure III.16 montre le thermogramme de l'huile constituée de triglycérides dont la composition en acides gras est dominée par le mélange ternaire acide oléique /acide arachidique / acide 11-eicosénoïque.

Les échantillons sont à l'état solide à température ambiante. Ils ont été refroidis à -50°C à 20°C/min, afin de comparer leur comportement physique en les soumettant à un traitement thermique identique.

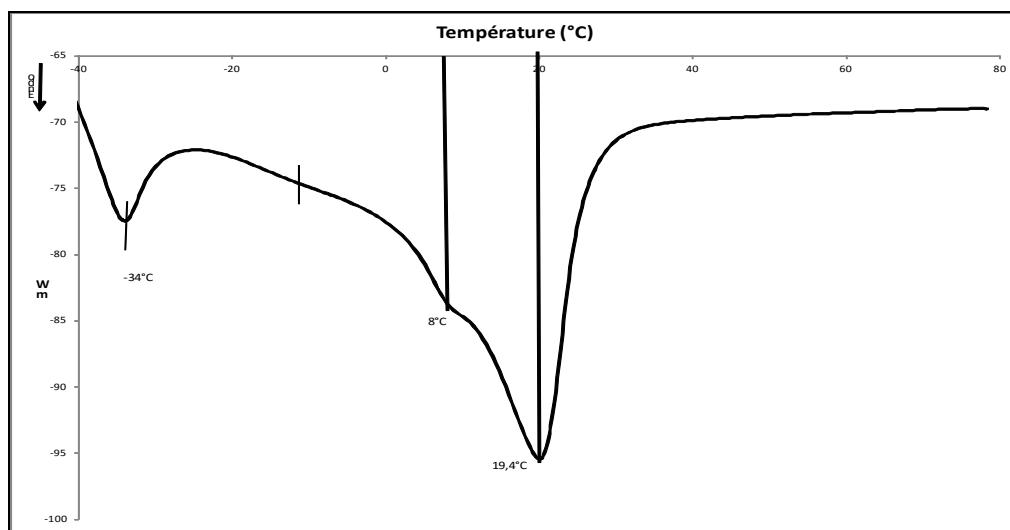


Figure III. 16 : Thermogramme de l'huile de *N. Lappaceum*.

Les triglycérides présentent 4 pics endothermiques : -34°C, -13°C, 8°C et 19,4°C. L'hydrolyse de ces triglycérides conduit au mélange d'acides gras dont le thermogramme est représentée par la figure III.17.

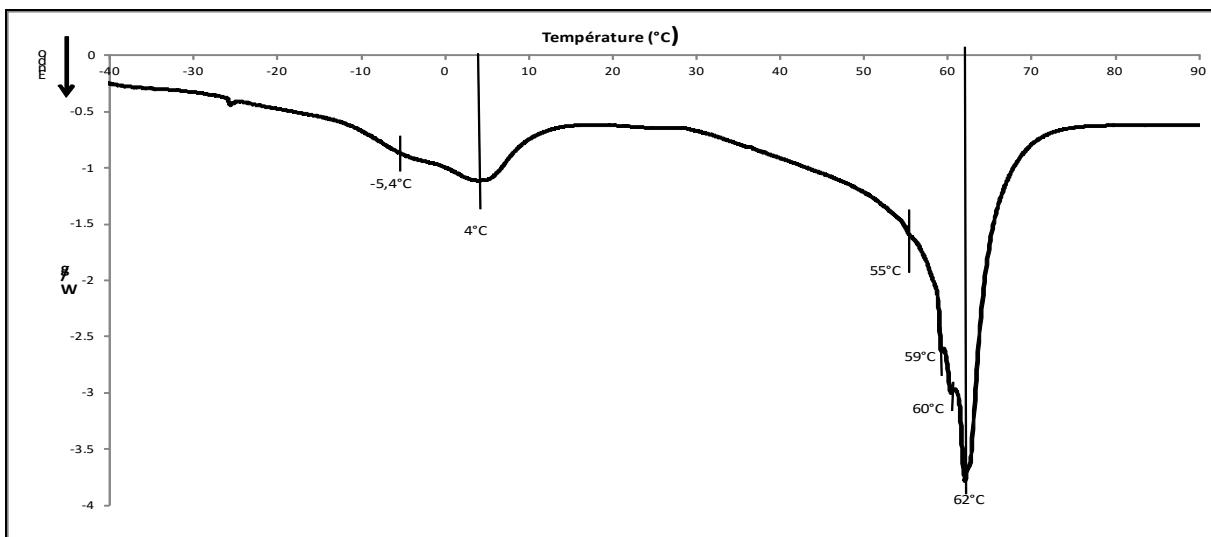


Figure III. 17: Thermogramme du mélange d'acides gras 98% de *N. Lappaceum* (39,6% C18 :1 ; 28,3% C20 :0 ; 16,13% C20 :1)

Ici, les principaux pics de changement de phase sont différents de ceux obtenus pour le mélange de triglycérides : -5,4°C, 4°C, 55°C, 59°C, 60°C, 62°C. Le polymorphisme semble être ici plus complexe que pour les triglycérides alors que la composition en acides gras est la même. La complexité polymorphique du système est encore exacerbée en analysant le mélange de monoglycérides synthétisés (figure III.18).

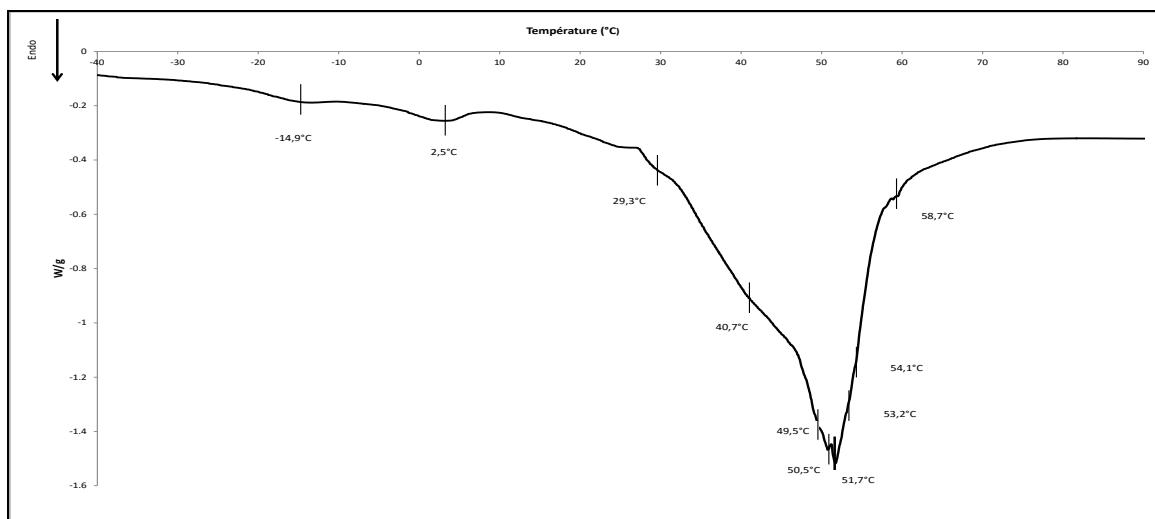


Figure III. 18 : Thermogramme du mélange de monoglycérides (47,2% MG-C18:1 ; 26,3% MG-C20:0 ; 10,9% MG-C20 :1) de *N. Lappaceum*.

Les pics endothermiques de changement de phase sont encore plus nombreux. Les principaux sont à -14,9 °C, 2,5 °C, 29,3 °C, 40,7 °C, 49,5 °C, 50,5 °C, 51,7 °C, 53,2 °C, 54,1 °C, 58,7 °C.

Ces analyses montrent que la complexité du polymorphisme croît dans l'ordre triglycérides – acides gras – monoglycérides. La longueur et la nature des chaînes grasses lipophiles peuvent être considérées comme constante car de même origine. La composition en acides gras est très proche pour les trois échantillons. Ces résultats montrent que l'influence de la nature de la partie hydrophile joue un rôle prépondérant dans l'organisation des ces systèmes lipidiques.

Le tableau III.10 résume les caractéristiques physiques et chimiques des échantillons étudiés suivant les compositions et les principaux pics de transition de phase.

Tableau III. 10: *Composition en acides gras majoritaires et caractéristiques thermiques des échantillons étudiés.*

Acides gras	Compositions (% molaires)		
	Huile N. <i>Lappaceum</i> TG	Acides Gras 98%	Monoglycérides 100%
A. Palmitique (C16:0)	4,9	8,2	5,3
A. Stearique (C18:0)	6,3	0,1	5,2
A. Oléique (C18:1n9c)	44,7	39,9	47,2
A. Linoléique (C18:2n6c)	2,7	7,7	5,1
A. Arachidique (C20:0)	28,6	26,6	26,3
A. Gadoléique (C20:1n9c)	8,1	16,1	10,9
Rapport acides gras insaturés/acides gras saturés	0,72	0,55	0,58
Pics de transition de phase	-34°C, -13°C, 8°C et 19,4°C	-5,4°C, 4°C, 55°C, 59°C, 60°C, 62°C	14,9°C, 2,5°C, 29,3°C, 40,7°C, 49,5°C, 50,5°C, 51,7°C, 53,2°C, 54,1°C, 58,7°C

Les pics apparaissant aux plus hautes températures pour chaque échantillon sont caractéristiques de la forme la plus stable de la molécule à l'état solide [43]. Cela correspond très souvent à des valeurs très proches des températures de fusion [44]. En observant les données des tableaux III.10 et III.11, il apparaît que la proportion d'acides gras saturés et insaturés est proches pour les 3 échantillons.

Tableau III. 11 : Températures de fusion de composés isolés d'après les données de la littérature.

	Température de fusion (°C)	références
Acide oléique	16	[34]
Acide arachidique	75	[34]
monooléate de glycérol	35	[34]
monoarachidate de glycérol	84	[34]
Monoeicosénoate de glycérol	Nd	
trioléate de glycérol	5,5	[34]
triarachidate de glycérol	78	[43]

Nd : non déterminé

Cependant, l'influence de ces derniers varie en fonction de la nature chimique des échantillons. Pour les triglycérides (huile de *N. Lappaceum*), les transitions de phase sont peu nombreuses et se situe à des températures basses, proches de celles présentées pour les acides gras monoinsaturés comme l'acide oléique. Au contraire, pour les échantillons d'acides gras 98 % et de monoglycérides 100 %, les transitions de phase sont nombreuses, et se situent à des températures élevées. L'influence des acides gras à chaînes saturées, à plus haut point de fusion tels que les acides gras monoisaturés, est prépondérante. Il semble donc que la nature chimique de la partie polaire détermine l'influence physique des monolécules.

L'organisation cristalline des acides gras et des monoglycérides de *N. Lappaceum* est confirmée comme l'illustrent les clichés de microscopie à polarisation croisée sur les figures III.19 et III.20.

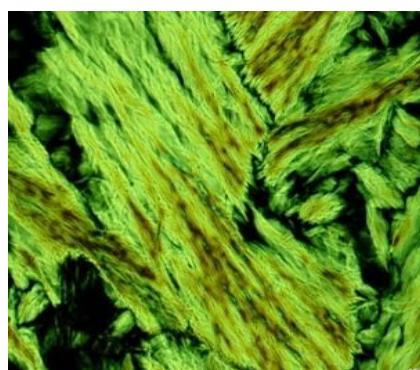


Figure III. 19 : Cliché de microscopie optique à polarisation croisée d'un échantillon d'acides gras 98% de *N. Lappaceum*, Grossissement ×100.

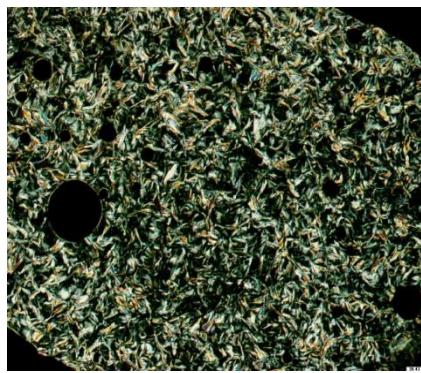


Figure III. 20 : *Cliché de microscopie optique à polarisation croisée d'un échantillon de monoglycérides 100%. Grossissement ×100.*

VI- CONCLUSION

L'hydrolyse enzymatique de l'huile de *N. lappaceum* révèle une composition en acides gras insaturés/acides gras saturés = 1,75. La composition de cette huile riche en acides gras essentiels possède les qualités requises en alimentation et présente une stabilité physique et chimique élevée. Lors de l'estérification des acides gras libérés par hydrolyse enzymatique, le rendement en monoglycérides C20 :0 et C20 :1 reflète la composition en acide gras de l'huile de *N. Lappaceum* avec un léger enrichissement en acide gras C20 :1. Une réaction est menée en présence d'eau sans apport de tiers solvant, pour laquelle le contact des réactifs est favorisé par l'organisation du système sous forme d'émulsions et microémulsion. La présence des composés à longue chaîne (C20:0 et C20:1) dans le mélange à de haute concentration pourrait influer sur les propriétés physiques notamment les températures de fusion qui vont être assez élevées (environ 60°C et même au-delà). L'avantage d'un tel mélange de monoglycérides obtenu va présenter un faible caractère polaire pour l'ensemble des monoglycérides avec de faibles valeurs de HLB, et une faible protection à la coalescence, de l'émulsion formée par ce type de tensioactifs. En outre, le mélange de monoglycérides obtenu offre une stabilité chimique de la double liaison des monoglycérides C18:1 et C20 :1 vis-à-vis de l'oxydation ou d'autre type de contraintes physico-chimiques (pH, lumière, température). Cette protection physico-chimique serait apportée par la conformation d'un monoglycéride C_{20:0} et la transition des phases issues d'un tel mélange, observée en DSC. Par ailleurs, le suivi du ratio insaturé/saturé en synthèse du mélange de monoglycérides à longue chaîne de carbone permet de contrôler les structures des mélanges obtenus, et par conséquent contrôler les propriétés

physico-chimiques, en particulier, les propriétés émulsifiantes en vue de l'application visée notamment dans le domaine agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Ce travail de lipochimie nous a permis de montrer aussi l'influence des acides gras purs isolés des huiles végétales pour la synthèse des monoglycérides à haute pureté. Leurs propriétés cristallines révèlent un mélange complexe des états cristallins. Des structures polymorphes sont engendrées par la présence des individus et de leur mélange. L'originalité du végétal. *N. lappaceum* est qu'elle produit une huile à teneur en acide arachidique la plus élevée (supérieur à celle du Jojoba) et qu'elle présente une teneur en acide monoinsaturé (acide eicosénoïque) comparable à celle du hareng mais plus stable thermiquement à l'oxydation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mouloungui Z., Mechling E., *Method for preparing fatty acids by hydrolysing in situ lipids contained in a plant seeds*, WO Pat. No 2004/022677, R28L3970/1702/2006.
2. Eychenne V., Mouloungui Z., *High concentration of 1-(3-)monoglycerides by direct partial esterification of fatty acids with glycerol*. Fett/Lipid, 1999. **101**(11): p. 424-427.
3. Deleu M., Vaca-Medina G., Fabre J.-F., Roïz J., Valentin R., Mouloungui Z., "Interfacial properties of oleosins and phospholipids from rapeseed for the stability of oil bodies in aqueous medium." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2010. **80**(2): p. 125-132.
4. Houde A., Kademi A., Leblanc D., *Lipases and their Industrial Applications*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004. **118**(1): p. 155-170.
5. Hou C., *Characterization of new yeast lipases*. Journal of American Oil chemists' Society, 1997. **74**(11): p. 1391-1394.
6. James J.J., Lakshmi B.S., Seshasayee A.S.N., Gautam P., *Activation of Candida Rugosa Lipase at Alkane-aqueous interfaces: A Molecular Dynamic Study*. FEBS Letters, 2007. **581**(23): p. 4377-4383.
7. Pawel G., Yunge.L., Joseph D.S., Miroslaw C., *Two conformational states of Candida Rugosa Lipase*. Protein Science, 1994. **3**(1): p. 82-91.
8. Sailas B., Ashok P., *Candida rugosalipases : Molecular biology and versatility in biotechnology*. Yeast 1998. **12**: p. 1069-1087.
9. Gautam P., S.A., Ravi S.R., Elavazhagan M., Rajeh S., *Lipase Database, Bioinformatics Division*.
10. Foresti M.L. , Ferriera M.L., *Computational Approach to Solvent-Free Synthesis of Ethyl Oleate Using Candida rugosa and Candida antarctica B Lipases. I. Interfacial Activation and Substrate (Ethanol, Oleic Acid) Adsorption*. Biomacromolecules, 2004. **5**(6): p. 2366-2375.
11. Anderson E.M., Larsson K.M., Kirk O., *One Biocatalyst-Many Applications: The Use of Candida Antarctica B-Lipase in Organic Synthesis*, . Biocatalysis and Biotransformation, 1998. **16**(3): p. 181-204.
12. Ibrahim C.O., Nishio N., Nagai S., *Fat Hydrolysis and Esterification by a Lipase from Humicola lanuginosa* Agricultural and Biological Chemistry, 1987. **51**(8): p. 2153-2159.
13. FFN, Ciqual R., *Table de composition des corps gras, Répertoire général des aliments*. 1987, Paris.: Tec & doc Lavoisier

14. Winayanuwattikun P., Kaewpiboon C., Piriyakananon K., Tantong S., Thakern k.W., Chulalaksananukul W., Yongvanich T., *Potential plant oil feed stock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand*. Biomass and bioenergy, 2008. **32**: p. 1279-1286.
15. Sirisompong W., Jirapakkul W., "Response surface optimization and characteristics of rambutan (*Nephelium lappaceum L.*) kernel fat by hexane extraction." LWT - Food Science and Technology, 2011. **44**(9): p. 1946-1951.
16. Kalayasiri P., Jeyashoke N., Krisnangkura K., *Survey of Seed Oils for Use as Diesel Fuels*. JAOCs, 1996. **73**(4): p. 471-474.
17. Augustin M.A, Chua B.C., *Composition of Rambutan Seeds*. Pertanika, 1988. **11**(2): p. 211-215.
18. Solís-Fuentes J.A., Camey-Ortíz G., Hernández-Medel M.d.R., Pérez-Mendoza F., Durán-de-Bazúa C., *Composition, phase behavior and thermal stability of natural edible fat from rambutan (*Nephelium lappaceum L.*) seed*. Bioresource Technology, 2010. **101**(2): p. 799-803.
19. Karmakar A., Karmakar S., Mukherjee S., *Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production*. Bioresource Technology, 2010. **101**(19): p. 7201-7210.
20. Kumar A., Sharma S., *Potential non-edible oil resources as biodiesel feedstock: An Indian perspective*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2011. **15**(4): p. 1791-1800.
21. Peyrou G., Rakotondrazafy V., *Separation and quantitation of mono-, di-, and triglycerides and free oleic acid using thin-layer chromatography with flame-ionization detection*. Lipids, 1996. **31**(1): p. 27-32.
22. Winsor P., *Solvent properties of amphiphilic compounds*. 1954, Londres: Butterworths.
23. Griffin W.C., *Classification of surface-active agents by 'HLB'*. Journal Society Cosmetic Chemistry, 1949 **1**: p. 311.
24. Griffin W.C., *Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants*. Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 1954. **5**: p. 259.
25. Davies J.T., "A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent," *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface*. . Proceedings of the International Congress of Surface Activity, 1957: p. 426-438.
26. Tadros T.F., *Applied Surfactants, Principles and Applications*. GmbH&Co Kga ed. 2005, Weiheim: Wiley-VCH Verlag.

27. Small D.M., *The Physical Chemistry of Lipids, From Alkanes to Phospholipids*. Handbook of Lipid Research. Vol. 4. 1986: Plenum Press, New York/London. 345-394.
28. Gunstone F.D., Padley F.B., *Lipid Technologies and Applications*. 1997, New York: Marcel Dekker Inc.
29. Pascher I., Sundull S., Hauser H., *Glycerol conformation and molecular packing of membrane lipids: the crystal structure of 2,3-dilauroyl-Dglycerol*. Journal of Molecular Biology, 1981. **153**: p. 791-806.
30. Pascher I., Lundmark M., Nyholm P.-G., Sundell S., *Crystal structures of membrane lipids*. Biochimica et Biophysica Acta, 1992(1113): p. 339-373.
31. Pascher I., *The different conformations of the glycerol region of crystalline acylglycerols*. Current Opinion in Structural Biology, 1996. **6**: p. 439-448.
32. Goto M., Honda K., Di L., Small D.M., *Crystal structure of a mixed chain diacylglycerol, 1-stearoyl-3-oleyl-glycerol*. Journal of lipid research, 1995. **36**: p. 2185-2190.
33. Di L., Small D.M., *Physical behavior of the mixed chain diacylglycerol, 1-stearoyl-2-oleyl-sn-glycerol: difficulties in chain packing produce marked polymorphism*. Journal of lipid research, 1993. **34**: p. 1611-1623.
34. Thomas A., *Fats and Fatty Oils. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
35. Bockisch M., *Fats and Oils Handbook*, Hambourg, Germany: AOCS presse.
36. Small D.M., *Glycerides*. D.J. Hanahan ed. The physical chemistry of lipids, from Alkanes to Phospholipids, Handbook of lipid research series. Vol. 4. 1986: New York: Plenum Press. 475-522.
37. Sato K., *Crystallization behaviour of fats and lipids. a review*, Chemical Engineering Science, 2001. **56**: p. 2255-2265.
38. Sato K., *Polymorphism of pure triacylglycerols and natural fats*. Advances in Lipid Research, 1996. **2**: p. 213-268.
39. Aronhime J., Sarig S., Garti N., *Emulsifiers as additives in fats: Effect of polymorphic transformations and crystal properties of fatty acids and triglycerides*. Food Structure, 1990. **9**(4): p. 337-352.
40. Aumaitre A., Bancourt H., Barsacq J.-C., Bernard D., *Manuel des corps gras*. 1992: Techniquen documentation Lavoisier.
41. Timms R.E., *Phase Behavior of Fats and Their Mixtures*. Progress in Lipid Research, 1984. **23**(1): p. 1-38.
42. Ollivon M., Perron R. *fat Science Proc. in 16th ISF Congres*. 1983.

43. Lutton E., Fehl A., *The polymorphism of odd and even saturated single acid triglycerides*. Lipids, 1970. **5**(1): p. 90-99.
44. Knothe G., Dunn R.O., *A Comprehensive Evaluation of the Melting Points of Fatty Acids and Esters Determined by Differential Scanning Calorimetry*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2009. **86**: p. 843-856.

CHAPITRES IV : Etudes des effets synergiques

Ce chapitre est subdivisé en deux parties :

- **Partie 1** : Evaluation de l'activité antioxydante des matrices biologiques natives et de leurs mélanges homogènes et hétérogènes (*effet du synergisme ou d'antagonisme sur l'activité antioxydante totale*)
- **Partie 2** : Evaluation des activités antimicrobienne, antifongique, antiplasmodiale, et anticancéreuse des matrices biologiques natives et de leurs combinaisons binaires (*effet du synergisme ou d'antagonisme sur certaines activités biologiques*)

PARTIE 1 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES MATRICES BIOLOGIQUES NATIVES ET DE LEURS MELANGES HOMOGENES ET HETEROGENES (EFFET DU SYNERGISME OU D'ANTAGONISME SUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE TOTALE)

I- INTRODUCTION

A l'issue du chapitre II portant sur la mobilisation, le transfert et la libération séquencée des huiles essentielles (HE) et des lipides de réserve (LR) à partir d'un même organe (coques, pulpes ouamandes), des questions stratégiques d'ordre scientifique, technologique, et de mise en formulation se posent telles que la synergie, la propriété biologique, la protection des huiles vis-à-vis des contraintes physico-chimiques. Faut-il privilégier la formulation de mélanges des deux familles chimiques HE et LR ou cibler des synergies d'effets biologiques par structure chimique, fonctionnalité entre les individus à l'intérieur et à l'extérieur de chaque famille ? Les résultats attendus devraient permettre d'élargir le spectre d'études des relations structures chimiques/propriétés/performances biologiques et contribuer à formuler ces matrices pour un usage alimentaire (graines de bouche), thérapeutique (pommade), ou simplement pour le stockage de ces matrices huileuses et leur conservation vis-à-vis des contraintes physico-chimiques.

Les résultats précédents (chapitre II) révèlent que les différentes parties (graines et coques) des espèces *A. stipulatum* et *A. giganteum* co-génèrent à la fois des espèces chimiques fonctionnelles tel que les monoterpènes, les sesquiterpènes d'une part, les tocophérols et les tocotriénols d'autre part confirmant que ces matrices ou organes sont des sites par excellence de bioaccumulation des métabolites secondaires fonctionnels. C'est pourquoi, ces espèces feront l'objet de choix pour l'étude synergique chimique et biologique.

Deux approches visant à évaluer les effets de synergie des HE et des LR sont entreprises. La première approche vise à préparer et à tester séparément les différentes matrices générées afin d'identifier les paramètres structuraux favorables à une organisation et à une manifestation d'activités biologiques. La seconde consiste à préparer des formulations à partir de ces matrices natives afin de montrer le synergisme ou l'antagonisme de leur activité biologique dans des systèmes émulsionnants générés à base des émulsifiants hydroxylés, des huiles natives, d'eau et d'autres composés liposolubles conventionnels (minéraux et vitamines).

Dans cette partie de notre travail, nous étudierons l'activité biologique, en particulier l'activité antioxydante des matrices natives seules et formulées. Afin d'évaluer cette activité, nous avons choisi le test avec le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle DPPH pour la simplicité de la méthode et sa compatibilité avec les matrices biologiques à étudier.

II- SYNERGISME, ADDITIVITE ET ANTAGONISME BIOLOGIQUE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le terme synergie signifie "travailler ensemble" en ce sens que l'effet total du mélange dépasse la somme des effets des composés individuels. L'additivité signifie "travailler l'un plus l'autre" en ce sens que l'effet total du mélange n'est que la somme des effets des composés individuels. L'antagonisme signifie "travailler l'un contre l'autre".

Les plantes, les fruits et les légumes peuvent différer entre eux notamment par la nature des composés bioactifs (fig.1) qu'ils contiennent et par les propriétés antioxydantes de ces composés. Souvent, lorsque ce type d'aliments sont consommés en même temps, la capacité antioxydante totale du mélange peut être modifiée par des interactions synergiques, additives ou antagonistes entre leurs composantes, ce qui peut en modifier l'action physiologique. Sun wang et al. (2011) ont montré que lors de la combinaison d'extraits de mûres et de haricots adzuki, des interactions synergiques ont été mises en évidence par différentes techniques d'analyses à sovoir : FRAP, DPPH, et ORAC[1]. Cependant, aucun changement de composition n'a semblé se produire dans le mélange.

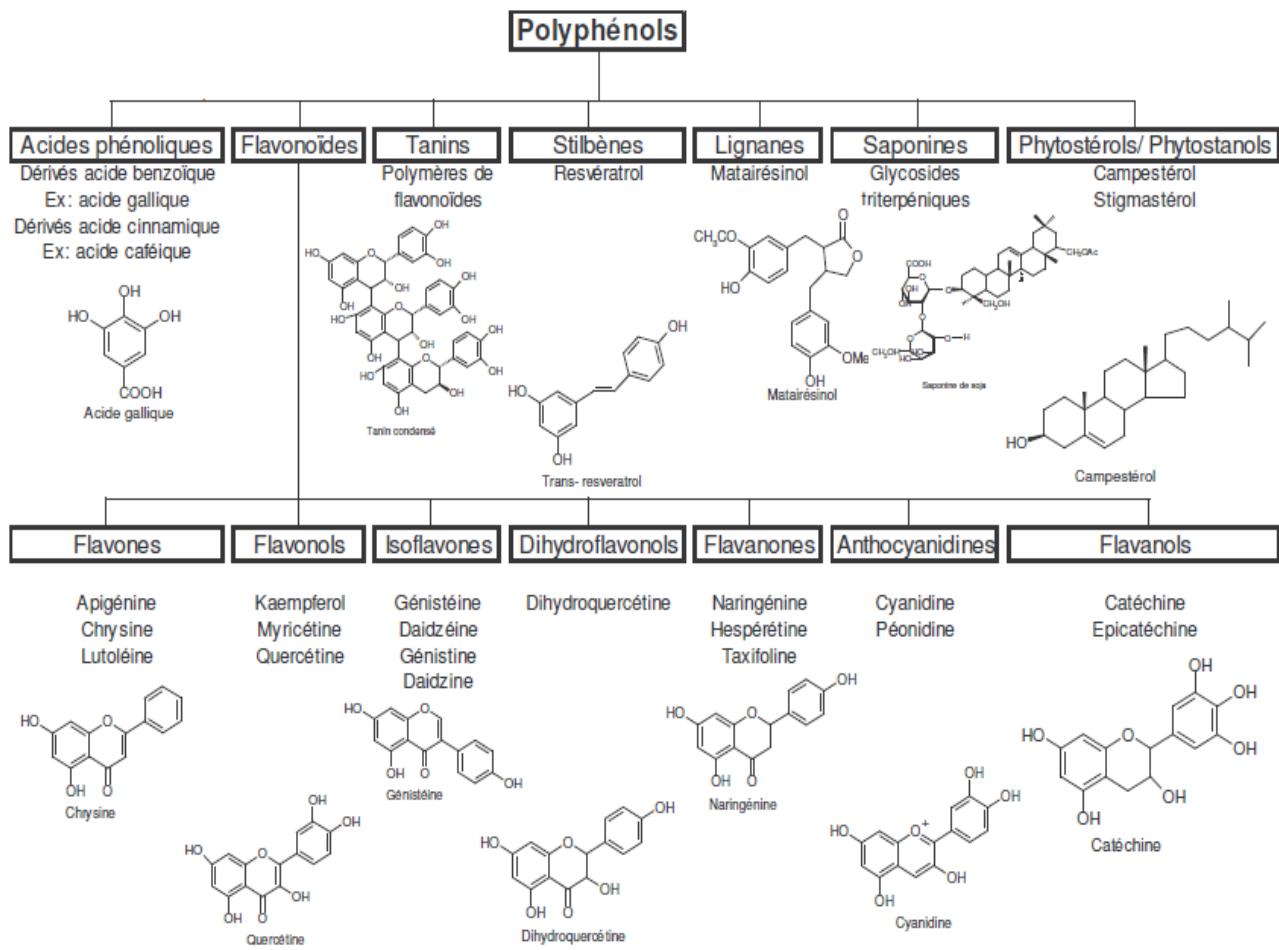


Figure IV.1 : Structure chimique des principaux polyphénols responsables de l'activité antioxydante chez les plantes, les fruits, et les légumes.

Les résultats de ces travaux laissent supposer qu'il est important d'exercer un choix stratégique en sélectionnant des aliments ou en privilégiant une alimentation favorisant les synergies et en défavorisant les antagonismes au point de vue de l'activité antioxydante.

Depuis la découverte des divers effets synergiques et antagonistes et leur importance dans le domaine thérapeutique, les interactions entre les agents biologiquement actifs sont devenues un sujet important pour la recherche scientifique.

Les huiles essentielles des plantes médicinales sont des mélanges complexes par leur nature. Etant un mélange cela représente un potentiel pour le développement d'interactions synergiques, additives ou antagonistes.

Les plantes produisent des composés phénoliques pour agir comme des molécules de signalisation cellulaire, des antioxydants ou des toxines nuisibles à l'invasion. En étudiant les composants des fruits, l'accent est mis sur les composés phénoliques en raison de leur capacité antioxydante élevée [2-4]. Il y a un écart entre la capacité antioxydante d'un composé

phénolique individuel à la concentration dans les fruits et la capacité antioxydante du fruit entier [5, 6]; car, on a constaté que la capacité antioxydante du fruit entier est supérieur. Les explications possibles à une telle différence peuvent être liées aux composés non identifiés dans le fruit ou à la somme totale de nombreux composés présents dans le fruit à faibles concentrations, ou encore aux interactions synergiques entre les composés phénoliques.

Lila et Raskin ont étudié l'additivité ou la potentialisation synergique en termes d'endo-interactions ou interactions au sein de la plante, les quelles peuvent modifier les effets pharmacologiques et en termes d'exo-interactions, interactions entre les composants et/ou les principes actifs non liés au sein de la plante [7]. Le synergisme des antioxydants grâce à des exo-interactions a connu une certaine attention. Yang et Liu ont rapporté que la combinaison d'un extrait de pomme et de quercétine 3-β-D-glucoside présente une activité antiproliférative synergique vis-à-vis des cellules cancéreuses du sein [8]. La combinaison d'extraits de soja, de luzerne phytoestrogène et d'extraits d'acérola de cerise, fonctionne en synergie pour inhiber l'oxydation des LDL *in vitro* [9]. Liao et Yin ont démontré que les combinaisons d'acide alpha-tocophérol et/ou ascorbique avec l'acide caféïque, la catéchine, l'épicatéchine, la myricétine, l'acide gallique, la quercétine et la rutine ont une activité antioxydante plus élevée que chacun des ces composés pris isolément pour l'oxydation des lipides [10]. Parker et *al.* ont montré des interactions synergiques entre certains mélanges de rutine, d'acide p-coumarique, d'acide abscissique, d'acide ascorbique et un mélange de sucre en utilisant la résonance paramagnétique électronique (RPE) et la technique ORAC [11]. Le synergisme des antioxydants semble se produire entre une grande variété de composés ou d'extraits ; d'où la nécessité d'une recherche supplémentaire pour explorer les endo-interactions au sein d'un aliment spécifique.

Aujourd'hui, il y a un intérêt à l'élaboration ou à la découverte des agents de conservation naturels et efficaces[12]. Les approches incluent l'utilisation des extraits [13, 14], des composés phénoliques [15], ou des mélanges de composés [16] comme des agents antimicrobiens. Comprendre les mécanismes derrière la fonctionnalité des mélanges d'antioxydants potentiels est important pour leur potentiel de développement en tant que conservateurs.

De ce qui précède, on constate que les études de la littérature déjà réalisées ont fait l'approche à partir d'un antioxydant individuel, ce qui n'est pas de nature à accéder aux effets bénéfiques des mélanges d'aliments, puisque les constituants bioactifs dans les plantes, légumes ou fruits comestibles sont toujours ingérés sous forme de mélanges naturels [17].

Dans cette partie du travail, l'approche proposée consiste à partir des matrices natives constituées de mélanges homogènes ou croisés (huiles essentielles et/ou huiles de réserves) des fruits sélectionnés et de rechercher la synergie éventuelle en processus exo-interactions tout en essayant de remonter au synergisme des endo-interactions par l'intermédiaire d'un antagonisme issu de la formulation de matrices natives. En particulier, l'activité antioxydante entre les mélanges homogènes et hétérogènes à partir des différents organes (coques ou graines) des fruits de *Aframomum* qui sera évaluée. Un modèle d'antagonisme sera étudié pour tenter d'expliquer la nature des interactions mises en jeu.

III- PARTIE EXPERIMENTALE

III-1. Evaluation de l'activité antioxydante : test avec le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (capteur de proton) est un radical libre, stable au cours du temps et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé quelconque [18, 19]. Le radical DPPH en solution est coloré en violet, en présence d'antioxydant (donneurs de proton) ; le radical DPPH est réduit en formant une liaison moléculaire stable. Le produit réduit présente une coloration qui tire vers le jaune. On mesure par la méthode spectrométrique UV à 517 nm, la diminution de coloration de la solution qui est proportionnelle à la quantité d'antioxydant.

L'évaluation de cette activité qui mesure le pourcentage d'inhibition de l'échantillon vis-à-vis du DPPH, s'est fait sur les extraits non volatils (lipidiques) et les huiles essentielles. Le protocole utilisé est celui de Masuda et Dina [20, 21].

III-1.1. Test des extraits non volatils (lipides)

Dans un tube en plastique, 2,5 mL d'extrait de concentration 50 µg/mL sont mélangés à 950 µL d'une solution méthanolique de DPPH (5 mM). Le mélange réactionnel est agité vigoureusement à l'aide d'un vortex (agitateur mécanique) et abandonné pendant 30 minutes dans l'obscurité. Le contenu est ensuite transféré dans un microtube en quartz. L'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. L'absorbance du blanc est obtenue en remplaçant la solution à tester par une solution méthanolique à égal volume.

III-1.2. Test des extraits d'huiles essentielles

La méthode est pratiquement la même que celle utilisée pour les extraits non volatils, sauf qu'ici, nous avons utilisé 50 µl d'huile essentielle diluée à l'éthanol mélangés à 2,5 mL d'une solution méthanolique de DPPH (5 mM). Chaque échantillon d'huile est préparé à différentes concentrations allant de 10 mg/mL à 200 mg/mL dans l'éthanol.

Le pourcentage d'inhibition (I %) est calculé comme suit :

$$I\% = \frac{(Absorbance\ du\ témoin - Absorbance\ de\ l'échantillon) \times 100}{Absorbance\ du\ témoin}$$

L'activité antiradicalaire est aussi exprimée en concentration efficace à 50% (CI₅₀). La CI₅₀ est la concentration de l'extrait ou de l'huile essentielle en µg/mL de DPPH, pour laquelle la diminution d'absorbance atteint 50 % de l'absorbance d'un blanc. La CI₅₀ permet de comparer l'activité des différents composés antioxydants. Il est à noter que plus la CI₅₀ est petite, plus l'antioxydant a une activité importante. La valeur de CI₅₀ est obtenue par extrapolation linéaire.

$$CI\ 50 = \frac{\text{Masse de composé testé (en } \mu\text{g. mL}^{-1} \text{ de DPPH)}}{\% \text{ d'inhibition}}$$

III-2. Matrices natives et méthodes de libération

Les graines et les coques des espèces *A. stipulatum* et *A. giganteum* ont été sélectionnés pour l'étude de la synergie de leurs huiles essentielles et celles de lipides de réserve comme matrices biologiques natives. Plusieurs méthodes de libération ont été testées pour l'obtention des huiles essentielles (Hydrodistillation) et des lipides de réserve (ASE et Soxhlet). Le principe des techniques de libération et les conditions opératoires ont été décrites et détaillées précédemment (voir chapitre II).

III-3. Formulation des matrices biologiques natives

L'huile essentielle est mélangée et homogénéisée avec la phase lipophile (émulsifiant). Ensuite le mélange est ajouté lentement à la phase aqueuse (eau déminéralisée) dans laquelle le sulfate de zinc (ZnSO₄.7H₂O), l'ascorbat de sodium (*C*₆H₇NaO₆) et l'acide brassilique (C₁₃H₂₄O₄) sont préalablement dissous ou mélangés. L'ensemble est homogénéisé avec un

Ultra-turrax (11000 trs/min) pendant 10 min à température ambiante et pression atmosphérique. Le laurate de sodium (solide cristallin à température ambiante) est fondu à 34 °C (température de fusion) avant le mélange avec la phase aqueuse. Dans toutes les préparations, l'huile essentielle constitue 5% en masse de la formulation finale. La figure 2 schématise les différentes étapes du protocole opératoire [22].

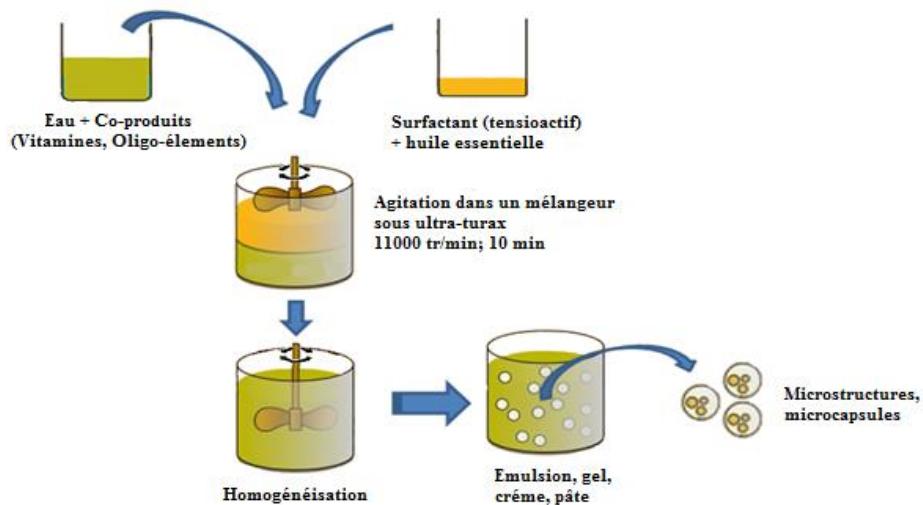


Figure IV.2: Schéma illustrant le protocole opératoire de la formulation [22].

IV- RESULTATS ET DISCUSSION

IV- 1. Evaluation de l'activité antioxydante (test DPPH)

IV- 1.1. Matrices natives individuelles

Les résultats relatifs à l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits lipidiques des deux espèces sélectionnées à partir des différents organes sont présentés dans le tableau 1 et comparés à deux molécules antioxydantes de référence : le trolox, un antioxydant synthétique et l'acide caféïque, un antioxydant naturel.

Les huiles essentielles et les extraits lipidiques obtenus des graines d'*A. stipulatum* présentent des valeurs de IC₅₀ respectivement 135 et 116 mg/L, alors que à partir des coques les IC₅₀ sont de 721 mg/L pour l'huile essentielle et de 110 mg/L pour l'extrait lipidique.

Les extraits des graines de *A. giganteum* présentent des IC₅₀ de 763 mg/L pour l'extrait lipidique et de 49 mg/L pour l'huile essentielle. Les valeurs IC₅₀ des extraits de la coque de *A.*

giganteum sont 284 et 620 mg/L respectivement pour l'huile essentielle et l'extrait lipidique. Les extraits lipidiques de graines et coques de *A. stipulatum* montrent des valeurs IC₅₀ inférieures à celles des extraits lipidiques de *A. giganteum*. Quant aux activités des huiles essentielles des graines et coques de *A. giganteum*, les valeurs IC₅₀ sont supérieures à celles de *A. stipulatum* (tableau IV.1).

Tableau IV.1: Activité antioxydante des matrices natives des espèces *A. stipulatum* et *A. giganteum* avec le DPPH.

Référence		IC ₅₀ mg/L	
Trolox		16	
Acide caféïque		9	
Espèces	Organe	Extrait lipidique	Huile essentielle
<i>A. stipulatum</i>	Graines	116	135
	Coques	110	721
<i>A. giganteum</i>	Graines	763	49
	Coques	620	284

Par ailleurs, les activités obtenues avec les huiles essentielles de coques de fruits de chaque espèce étudiée restent très faibles par rapport aux références. L'huile essentielle extraite à partir des graines d'*A. giganteum* présente une activité remarquable 3 fois moins que le Trolox et 5,4 fois moins que l'acide caféïque. Cette activité pourrait être expliquée par la présence d'alloaromadendrene, β-Eudesmol ou du mélange d'autre composé sesquiterpène hydrocarboné non présent dans le profil chimique des autres matrices (voir Tableau II.11, Chapitre II).

Etant donné que l'huile essentielle est un mélange des composés appartenant à des familles chimiques diverses, la variation des valeurs moyennes de IC₅₀ des différentes huiles essentielles des *Aframomum* serait due à leur composition chimique. En général, les huiles essentielles riches en composés oxygénées présentent une activité anti radicalaire plus marquée que celles à terpènes hydrocarbonés [23]. En effet, les huiles essentielles d'*A. giganteum* sont plus riches en composés mono- et diterpènes oxygénées (graines 23,66 % et coques 59,49 %) que celles de *A. stipulatum* (graines 17,99 % et coques 58,05 %). Néanmoins, la manifestation de ces activités n'est pas cohérente avec l'hypothèse ci-dessus et peut être due à la présence de certains composés particuliers ou à leurs effets de synergie.

L'activité antioxydante des extraits lipidiques pourrait s'expliquer par la présence des composés terpéniques oxygénés identifiés (voir chapitre II) et aussi par la présence des constituants mineurs tels que les polyphénols (tocophérols), qui bloquent la production des radicaux libres [24]. mais les faibles valeurs de IC₅₀ pourraient être due à la teneur respective de ces composés dans les extraits [25, 26].

III-1.2. Mélanges croisés

L'activité antioxydante des extraits lipidiques des graines et des coques de deux espèces de *Aframomum* est présentée dans le tableau IV.2.

Tableau IV. 2: *Evaluation de l'activité antioxydante totale des mélanges croisés d'extraits lipidiques des graines et coques de A. stipulatum et de A. giganteum comparés avec celle des matrices natives individuelles.*

N° mélange	Extraits lipidiques ou mélange d'extraits lipidiques	IC ₅₀ (mg/L)
	Coques <i>A. giganteum</i>	874
	Graines <i>A. giganteum</i>	845
	Coques <i>A. stipulatum</i>	862
	Graines <i>A. stipulatum</i>	853
1	Coques <i>A. stipulatum</i> + Coques <i>A. giganteum</i>	996
2	Graines <i>A. stipulatum</i> + Coques <i>A. giganteum</i>	1187
3	Coques <i>A. stipulatum</i> + Graines <i>A. stipulatum</i>	1218
4	Coques <i>A. giganteum</i> + graines <i>A. giganteum</i>	1589

Des activités antioxydantes antagonistes ont été observées après le mélange des différents extraits.

Pour une concentration fixée à 1,5 mg/mL d'extrait huile dans le méthanol, tous les extraits d'huile nous ont présenté une activité moyenne de 886 mg/L face à une solution de DPPH 5mM. L'extrait de l'huile de graine d'*A. stipulatum* associé aux extraits de coques d'*A. stipulatum* présente une activité (1187mg/L) similaire à son association avec l'extrait de coques de l'espèce *A. giganteum* (1218mg/L). La combinaison des huiles extraites des graines et coques de l'espèce *A. giganteum* présente la plus faible inhibition (1985 mg/L) du radical DPPH. Ce résultat significatif d'extraits lipidiques de *A. giganteum* pourrait être expliqué par un effet d'antagonisme entre les différents constituants biologiques mineurs de la coque et

celles de la graine, issus de métabolite secondaire, puisque les extraits lipidiques présentent individuellement une meilleure activité antioxydante (tableau IV.1 et IV.2).

Un léger antagonisme est aussi observé pour le mélange n°1. Dans tous les cas, on constate d'après l'activité antioxydante totale mesurée que les mélanges possèdent un effet antagoniste plus ou moins marqué que les matrices individuelles. Il est important de ne noter qu'aucun effet de synergisme est observé pour les mélanges préparés. Ces résultats *in vitro* confirment que l'approche traditionnelle (consommation de ces fruits sans la coque et les graines) est satisfaisante, puisque le mélange des huiles natives des chaque partie (coque et graines) renferme des composés bioactifs (voir chapitre II) dont le mélange favorise l'effet d'antagonisme montré par l'activité antioxydante totale des mélanges préparés.

III-1.3. Mélanges hétérogènes

À l'issu de ce criblage biologique, l'huile essentielle extraite des graines de *A. giganteum* a révélé l'activité antioxydante la plus intéressante ; c'est ainsi que l'huile essentielle des graines de *A. giganteum* est retenue comme candidat pour étudier les interactions d'antagonisme à travers des essais de formulation.

La formulation consiste à fabriquer des mélanges hétérogènes stables possédant des propriétés spécifiques, en mélangeant différentes matières premières. La formulation comprend généralement un ou plusieurs composés actifs et différents *additifs* (vitamines, *colorants*, arômes, eau, *solvants*, adjuvants, minéraux, *charges*, *conservateurs*...). Selon la nature chimique, la polarité et la structure des ingrédients de la formulation, on distingue les systèmes de séquestration ou d'encapsulation des huiles essentielles à base d'émulsions. Ces systèmes émulsionnants basés sur l'assemblage moléculaire hydrophobe/hydrophile réduisent les interactions physico-chimiques entre les divers ingrédients limitant ainsi leur mobilité dans le mélange. Cependant, elle est réversible sous l'action d'une contrainte physique (T°C, lumière, humidité) ou chimique (pH, oxydation, enzyme), permettant ainsi la libération des composés actifs et par suite leur action biologique.

Le développement de formulations permettant d'obtenir l'absorption contrôlée et ciblée de substances actives est toujours d'un grand intérêt. Depuis quelques années, un des axes principaux de la recherche dans le domaine de la microencapsulation concerne les vecteurs nano et microparticulaires de nature polymérique ou lipidique. Les systèmes de formulations sont nombreux et variés [27, 28] aussi bien dans leur composition que dans leur mode

d'obtention. Les paramètres qui gouvernent leurs propriétés physicochimiques sont tout aussi nombreux.

Trois types de formulation à base de trois émulsifiants (figure IV.3) ont été préparés et leur activité antioxydante a été testée [22].

- formulations à base de tensioactif neutre (ricinoléate de glycérol éthoxylé ou Bredol 696 nom commercial, grade alimentaire),
- formulations à base de tensioactif amphotère (phosphatidylcholine ou lécithine),
- formulations à base de tensioactif anionique (laurate de sodium).

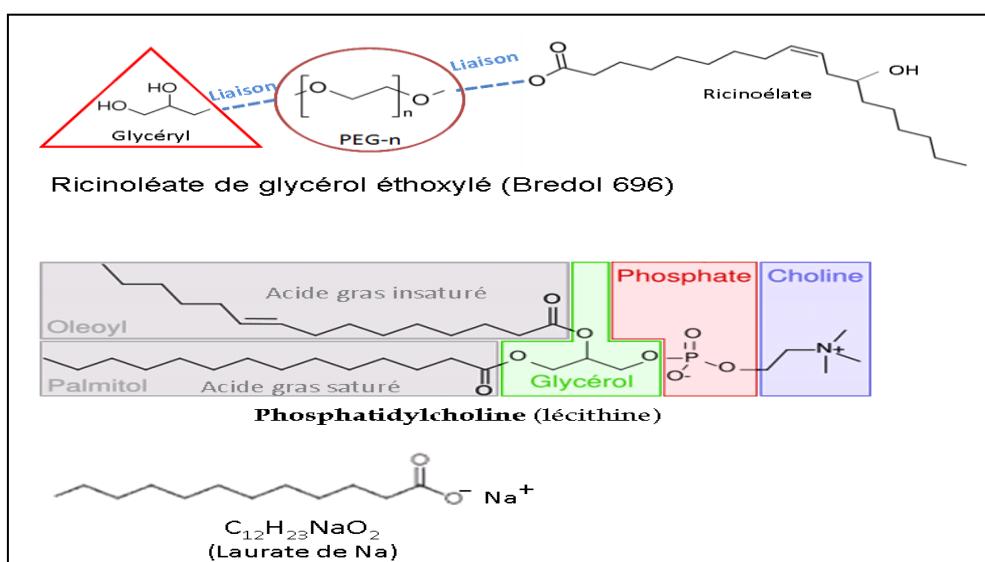


Figure IV.3 : Structures chimiques des trois émulsifiants mis en œuvre dans la préparation des formulations [22].

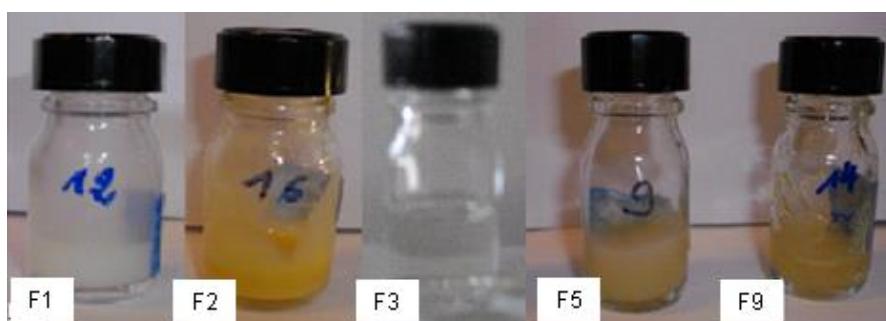


Figure IV.4 : Photos de quelques formulations préparées avec l'huile essentielle extraite des graines de l'espèce *A. giganteum*

Tableau IV.3 : Différentes mélanges hétérogènes (formulations) préparés avec l'huile essentielle extraite des graines de l'espèce A. giganteum. (% massique).

Ingrédients (%)	Formulation								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Bredol	25	-	-	24	30	30	30	10	30
Lécithine	-	25	-	-	-	-	-	10	-
Laurate de Na	-	-	25	-	20	-	20	10	20
Acide brassilique	-	-		8	-	-	-	8	-
Huile essentielle	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Eau	70	70	70	53	37	55	37	47	37
Ascorbate de Na	-	-	-	6	8	6	-	6	8
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	4	-	4	8	4	-
Observations									
Aspect physique	hydrogel laiteux	pâte	liquide transparent	pâte	hydrogel crème	hydrogel	hydrogel	crème	hydrogel
Odeur	masquée	partiellement masquée	non masquée	masquée	masquée	masquée	masquée	bien masquée	masquée
Couleur	blanche	jaunâtre	incolore	blanche	beige	blanche	blanche	jaunâtre	Beige claire

L'aspect physique ainsi que la texture des trois systèmes de formulation sont différents. Un hydrogel laiteux est observé avec le ricinoléate de glycérol éthoxylé (Bredol), une émulsion lipidique jaunâtre dans le cas de la lecithine, et une microémulsion translucide dans le cas du laurate de sodium (figure 4).

Du point de vue olfactif, l'odeur de l'huile essentielle était masquée dans la préparation avec la lécithine, moins masquée dans celle avec le Bredol, forte fragrance dans la préparation avec le laurate de sodium. Ces différents aspects physiques et olfactifs sont relativement dus aux types d'interactions physico-chimiques générées dans chaque mélange. En effet, le Bredol est un polymère qui en présence de l'eau forme des liaisons d'hydrogènes produisant ainsi un hydrogel visqueux (figure IV.4). D'autre part, sa structure amphiphile lui permet de tisser des liaisons d'hydrogènes avec les composés (principalement hydroxylés) volatils de l'huile essentielle réduisant ainsi leur odeur dans le mélange. Dans le cas de la lécithine, une émulsion huile dans eau (H/E) est formée en présence d'eau et l'huile essentielle, par la séquestration de l'huile au sein d'une double couche lipidique organisée autour d'un cœur hydrophobe (ici, l'huile essentielle) avec l'eau comme phase continue. Ce système émulsionnant d'encapsulation (H/E) permet le masquage d'odeur de l'huile essentielle. Quant au laurate de sodium, sa structure anionique (fig.3) ne lui permet pas de créer des liaisons d'hydrogènes, pourtant il entraîne la formation des cristaux liquides à organisation lamellaire en présence d'eau (figure IV.5) ce qui est confirmé par les analyses microscopiques par la présence des croix de malt en 2D.

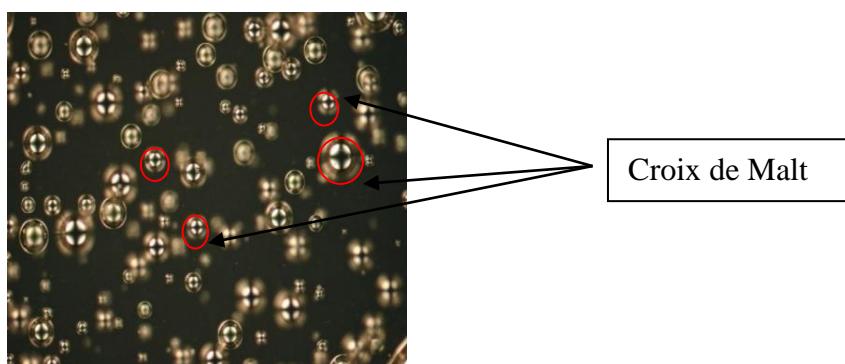


Figure IV.5 : Cliché de microscope optique en polarisation croisée de la formulation F3 montrant l'organisation lamellaire (crois de Malt) du laurate de sodium dans une émulsion huile/eau. Grossissement $\times 100$.

L'activité antioxydante de certaines formulations a été évaluée face au DPPH et les résultats consignés dans le tableau IV.4 sont ceux pour lesquelles la valeur de IC₅₀ a pu être calculée. Notons que, la valeur IC₅₀ de l'activité antioxydante de certaines formulations n'était pas

exploitable vu l'aspect et la complexité du mélange d'une part, et la possible synergie de certains ingrédients de la formulation avec le DPPH d'autre part. Des valeurs d'absorbance supérieures à celle du DPPH seul ont été obtenues, et à cet effet, le calcul des IC₅₀ était impossible.

La formulation F4 montre une activité antioxydante nettement plus faible comparée avec l'huile essentielle native. En effet, cette formulation contient en plus de l'huile essentielle de l'ascorbat de sodium (tableau 3) un antioxydant puissant. Cependant, sa valeur antioxydante est 12 fois moins faible que l'huile essentielle seule. Aussi, cette formulation contient un diacide (acide brassilique) et un minéral chargé (Zn²⁺), qui participeront à la complexation des composés oxygénés de l'huile (monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés) par des liaisons hydrogènes et électroniques respectivement. Ce caractère complexant diminue la mobilité et l'effet biologique des composés actifs présents dans l'huile essentielle d'*A. giganteum* sans oublier le rôle du Bredol cité ci-dessus. Ce résultat confirme l'antagonisme entre l'huile et les divers constituants de la formulation. Dans le cas de la formulation F6, la valeur de l'activité antioxydante est presque 2 et 23 fois plus faible que la formulation F4 et l'huile essentielle native respectivement (tableau IV.4). En effet, l'absence du diacide dans le mélange augmente l'antagonisme entre les divers constituants de la formulation conduisant à la diminution de la valeur de l'IC₅₀.

Tableau IV.4 : Activité antioxydante des antioxydants de références, de l'huile essentielle de *A. giganteum*, et des différentes formulations réalisées avec le test DPPH.

Echantillon	IC ₅₀ (mg/L)
Trolox	16
Acide caféïque	9
Catéchine	17
HE <i>A. giganteum</i>	49
F4	597
F6	1149

D'après les résultats obtenus sur les trois types de mélanges ci-dessus, un ordre décroissant de l'activité antioxydante totale pourra être établi comme suivant: matrices natives individuelles > mélanges hétérogènes > mélanges homogènes. Ce classement montre bien que les mélanges homogènes ou hétérogènes conduisent à une diminution de l'activité antioxydante totale

comparée à celle des matrices individuelles. Cependant, l'antagonisme antioxydant dans le cas des mélanges hétérogènes (formulations) est légèrement inférieur à celui des mélanges homogènes.

Il faut noter que les polyphénols (non analysés dans cette étude) des huiles natives sont les responsables majeurs de l'activité antioxydante des plantes, des fruits, des légumes et autres types d'aliments [29, 30]. La corrélation positive entre les composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante des huiles essentielles et les aliments a été reportée [31]. L'antagonisme antioxydant apparent des mélanges hétérogènes est probablement dû à un changement de profil des composés phénoliques grâce aux systèmes complexes mis en jeu telles que l'émulsification et la complexation.

a) Modèle des émulsions

Une émulsion est une dispersion colloïdale de deux liquides non miscibles l'un dans l'autre tels que l'eau et l'huile, à laquelle on ajoute généralement un agent de surface (tensioactif ou émulsifiant). Le processus de dispersion consiste à cisailier l'une des phases dans l'autre de manière à former des gouttes dont la taille peut varier de 0,1 µm à environ 10 µm. Les émulsions simples sont formées de gouttes liquides dispersées dans une phase continue.

Les émulsions doubles (appelées aussi multiples) sont des émulsions particulières, dans le sens où la phase dispersée est elle aussi une émulsion. Ces émulsions (simples ou doubles) (figure 6) sont qualifiées de « directes » ou « inverses », selon la nature aqueuse ou huileuse de la phase continue [28]. Il est important de noter que les mélanges hétérogènes préparés dans ce travail sont des émulsions de type huile dans eau.

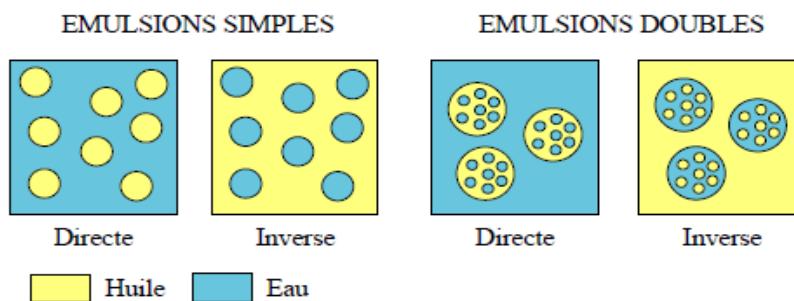


Figure IV.6 : Schéma simplifié des émulsions simples et doubles avec l'huile ou l'eau comme phase continue.

Il est connu que les émulsions sont des systèmes de séquestration et de protection qui réduisent fortement les interactions physiquo-chimiques et les échanges de la phase non continue avec le milieu extérieur limitant ainsi tout type de synergisme de la phase séquestrée. Ce modèle d'antagonisme est en cohérent avec le masquage observé de l'odeur et la baisse de l'activité antioxydante de l'huile essentielle extraite des graines de l'espèce *A. giganteum* après sa formulation.

b) Modèle de complexation

La complexation des composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoides, flavonols, vitamines, etc.) vis-à-vis des métaux bi ou trivalents a été largement étudiée dans la littérature [32-37]. En effet, en présence de cations les composés phénoliques des huiles essentielles et lipidiques des plantes, des fruits, et légumes joueront le rôle des agents chélateurs ou ligands. Leur force de chélation dépend des paramètres physico-chimiques, en particulier du pH, de la température et de leur solubilité. Dans ce travail, un antioxydant exogène, l'ascorbate de sodium (sel de l'acide ascorbique ou de la vitamine C) a été apporté dans certains mélanges hétérogènes afin d'augmenter l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*A. giganteum* par synergie. Pourtant, l'activité de ces mélanges hétérogènes s'est vue diminuée au lieu d'augmenter. Ce phénomène est expliqué par les exo-interactions issues de la complexation de l'ascorbate de sodium avec le zinc (oligo-élément exogène à la formulation). En outre, les composés phénoliques présents dans l'huile essentielle d'*A. giganteum* ont subi le même sort que l'ascorbate de sodium. Ce modèle de complexation au sein des mélanges hétérogènes vis-à-vis des molécules antioxydantes a fait chuter l'activité antioxydante totale (Tableau 4).

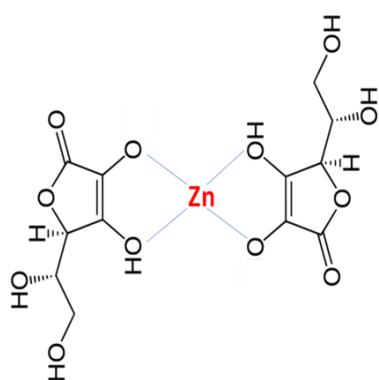


Figure IV.7 : Modèle de complexation de l'acide ascorbique avec le zinc suggéré par Obaleyé et Orjiakwe (1998) [38].

V- CONCLUSION

Dans cette première partie de ce chapitre, nous avons mis en évidence par le test DPPH l’antagonisme antioxydant de l’extrait lipidique ou d’huile essentielle des différentes parties (graines et coques) du fruit du genre *Aframamom*. Cependant, l’ajout des antioxydants exogènes ne crée pas toujours des effets positifs mais aussi peut produire des effets négatifs sur l’activité antioxydante totale. Il semble que ces effets négatifs sont fortement liés à l’environnement physico-chimique des molécules antioxydantes présentes dans les extraits huileuses (HE et LR), en particulier, à celui des composés phénoliques. Aussi, cette étude montre que l’antagonisme est dû à des endo-interactions entre les composés phénoliques de chaque matrice biologique (cas des mélanges homogènes) et à des exo-interactions avec les différents ingrédients de la formulation (cas des mélanges hexogènes). Les résultats de l’activité antioxydante obtenus permettent de suggérer une application alimentaire (graines de bouches) pour les matrices natives individuelles, soit une application de stockage et de libération pour les mélanges hétérogènes (formulations). Pour les mélanges homogènes, il est possible d’étudier l’effet du ratio des huiles sur l’activité antioxydante totale. Enfin, cette étude *in vitro* nécessite une confirmation par une étude *in vivo* puisque les interactions physiologiques font appel à des phénomènes de synergisme et d’antagonisme encore plus complexes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Sunan W., Kelly A.M., Massimo F.M., Yukio K., Rong T., *Synergistic, Additive, and Antagonistic Effects of Food Mixtures on Total Antioxidant Capacities*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**: p. 960-968.
2. Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W., *Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits*. Food Chemistry, 1999. **66**: p. 401-36.
3. Franke A., Custer L., Arakaki C., Murphy S., *Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii*. Journal of Food Composition and Analysis, 2004. **17**: p. 1-35.
4. Harnly J.M., Doherty R.F., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Bhagwat S., Gebhardt S., *Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables and nuts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**: p. 9966-77.
5. Miller N.J., Rice-Evans C.A., *The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink*. Food Chemistry, 1997. **60**: p. 331-7.
6. Zheng W., Wang S.Y., *Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**: p. 502-9.
7. Lila M.A., Raskin I., *Health-related interactions of phytochemicals*. Journal of Food Science, 2005. **70**(1): p. R20-27.
8. Yang J., Liu R.H., *Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-β-D-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells in vitro*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**: p. 8581-6.
9. Hwang J., Hodis H.N., Sevanian A., *Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**: p. 308-14.
10. Liao K., Yin M., *Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**: p. 2266-70.
11. Parker T.L., Miller S.A., Myers L.E., Miguez F.E., Engeseth N.J., *Evaluation of synergistic antioxidant potential of complex mixtures using oxygen radical absorbance*

- capacity (ORAC) and electron paramagnetic resonance (EPR).* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**: p. 209-17.
12. Galal A.M., *Natural product-based phenolic and nonphenolic antimicrobial food preservatives and 1,2,3,4-tetrahydroxybenzene as a highly effective representative: a review of patent literature 2000-2005.* Recent Pat Antiinfect Drug Discov 2006. **1**: p. 1231-9.
 13. Serra A.T., Matias A.A., Nunes A.V.M., Leit~ao M.C., Brito D., Bronze R., Silva S., Pires A., Crespo M.T., San Rom~ao M.V., Duarte C.M., *In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food.* Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008. **9**: p. 311-19.
 14. Conte A., Scrocco C., Sinigaglia M., Del Nobile M.A., *Lemon extract as natural preservative in fruit salad.* Journal of Food Safety, 2009. **29**: p. 601-16.
 15. Rodriguez Vaquero M.J., N.M.C.M., *Growth parameter and viability modifications of Escherichia coli by phenolic compounds and Argentine wine extracts.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008. **151**: p. 342-52.
 16. Oliveira C.E.V., d.S.T.L.M., Gomes Neto N.J., de Souza E.L., *Inhibition of Staphylococcus aureus in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids.* International Journal of Food Microbiology, 2010. **137**: p. 312-16.
 17. Lila M.A., *Interactions between flavonoids that benefit human health.* In Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, And Application, K. Gould, Davies, K., Winefield, C., Editor. 2009, Springer ScienceþBusiness Media: New York. p. 305-320.
 18. Cotelle N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C., Gaydou E.M., *Antioxidant properties of hydroxy-flavones.* Free Radic. Biol. Med., 1996. **20**: p. 35 - 43.
 19. Trouillas P., Calliste C.A., Allais D.P., Simon A., Marfak A., delage C., Duroux J.L., *Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen plant extracts used in the Limousin countryside as herbel tea.* Food chemistry, 2003. **80**(3): p399-407.
 20. Dina A., Nassima C., Meriem B., Karima A., Hakima L., Hania B., Nadjet D., Djebbar A., *Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants.* Food chemistry, 2009. **112**: p. 303-309.
 21. Masuda T., Yonemori S., Oyama Y., Takeda Y., Tanaka T., Andoh T., *Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants.* Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1999. **47**(4): p. 1749-1754.
 22. Mouloungui Z., Zebib B., Eclache D., Etienne P., Noirot V., *Method for protecting active principles using glycérol,* in Patent WO/2010/049621.

23. Benov L., Georgeiv N., *The antioxidant activity of Flavonoids Isolated from Corylus columna*. Phytotherapy Research, 1994. **8**(2): p. 92-94.
24. Caraballo A., Caraballo B., Rodríguez-Acosta A., *Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Amazon*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2004. **37**(2): p. 186-188.
25. Berger M., Ayerdi-Gotor A., Sarrafi A., Maury P., Daydé J., Calmon A., *Que sait-on du déterminisme de la qualité des huiles du tournesol face aux nouvelles attentes Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 2010. **17**(3): p. 173-184.
26. Zacheo G, Capello M., Gallo A., Santino A., Cappello A.R., *Changes associated with post-harvest ageing in almond seeds*. Food Science and Technology, 2000. **33**: p. 415-423.
27. Kreuter J., *Nanoparticles*. J. Kreuter ed, ed. C.D.D. Systems. 1994, New York: Marcel Dekker. 219-343.
28. Guery J., *Emulsions doubles cristallisables: stabilité, encapsulation et relargage*, in *Ecole doctorale de Physique et Chimie des Matériaux*. 2006, Université Paris VI: Paris. p. 178.
29. Naczk M., Shahidi F., *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence extraction and analysis*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2006. **41**: p. 1523-1542.
30. Ninfali P., Mea G., Giorgini S., Rocchi M., Bacchicocca M., *Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition*. Br. J. Nutr, 2005. **93**: p. 257-266.
31. Fernandez-Panchon M.S., Villano D., Troncoso A.M., Garcia- Parrilla M.C. , *Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2008. **48**: p. 649-671.
32. Ratty A.K., Das N.P., *Effects of flavonoids on non-enzymic lipid peroxidation: structure activity relationship*. Biochem. Med. Metabol. Biol., 1988. **39**(69-79).
33. Hodnick W.F., Milosavljevic E.B., Nelson J.H., Pardini R.S., *Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids*. Biochem. Pharmacol, 1988. **37**(13): p. 2607-11.
34. Sichel G., Corsaro C., Scalia M., Di Bilio A.J., Bonomo R.P., *In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂-(-)*. Free Radic. Biol. Med, 1991. **11**(1): p. 1-8.
35. Suzuki N., *Antioxidative activity of some biologically active compounds with active oxygen species*. Spectrum 6, 21–26. Spectrum, 1993. **6**: p. 21-26.

36. Jovanovic S.V., Steeken S., Tasic M., Marjanovic B., Simic B., *Flavonoids as antioxidants*. J. Am. Chem. Soc., 1994. **116**(4846-4851).
37. Brown J.E., Khodr H., Hider R.C., Rice-Evans C.A., *Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties*. Biochem. J., 1998. **330**(Pt 3): p. 1173-8.
38. Obaley J.A., Orjiiekwe C.L., *Bivalent metal complexes of sodium ascorbate*. J. Sci. I. R. Iran, 1998. **9**(2): p. 148-152.

PARTIE 2 : EVALUATION DES ACTIVITES ANTIMICROBIENNE, ANTIFONGIQUE, ANTIPLASMODIALE, ET ANTICANCEREUSE DES MATRICES BIOLOGIQUES NATIVES ET DE LEURS COMBINAISONS BINAIRES (EFFET DU SYNERGISME OU D'ANTAGONISME SUR CERTAINES ACTIVITES BIOLOGIQUES)

I- INTRODUCTION

Le terme "huile essentielle" a été utilisé pour la première fois au 16^{ème} siècle par Paracelse von Hohenheim, qui s'est référé à la composante efficace d'un médicament comme "Quinta essentiel" [1]. La première référence portant sur les usages des huiles essentielles pour des fins thérapeutiques a été trouvé dans le papyrus d'Ebers. Ce document décrit en détail les remèdes et les traitements de plus de 800 huiles essentielles et montre que la myrrhe était un ingrédient favori, souvent mélangée avec du miel et d'autres herbes, en raison de sa capacité à inhiber la croissance bactérienne. La première expérience bactéricide des huiles essentielles est dit avoir été effectuée par de la Croix en 1881 [2]. Toutefois, depuis cette époque l'utilisation des huiles essentielles en médecine n'a pas cessé d'augmenter [3].

Les huiles essentielles, également connus sous le nom des huiles volatiles, sont des mélanges complexes de constituants volatils biosynthétisés par les plantes, qui comprennent principalement deux groupes bio-synthétiquement liés [4]. Ces principaux groupes comprennent les terpènes, les terpénoïdes et les constituants aromatiques et aliphatiques, tous caractérisés par un faible poids moléculaire.

La plupart de l'activité antimicrobienne dans les huiles essentielles se trouve dans les terpénoïdes oxygénés (par exemple, les alcools et les terpènes phénoliques), tandis que certains hydrocarbures présentent également des effets antimicrobiens [5-7]. Les interactions entre ces composants peuvent entraîner des effets antagonistes, additifs ou synergiques. Certaines études ont démontré que l'ensemble des huiles essentielles ont généralement une plus grande activité antibactérienne que les mélanges de leurs principaux composants, ce qui suggère que les composants mineurs sont essentiels à l'activité synergique. Cependant, des effets antagonistes et additifs ont également été observés [8, 9]. Habituellement, les combinaisons sont des mélanges simples des huiles essentielles ou des mélanges combinés

des principaux composants purifiés, qui affectent de multiples processus biochimiques dans les bactéries, produisant une multitude d'effets antibactériens interactifs [7, 10].

Ces dernières années, il a eu un intérêt accru dans l'utilisation des agents antimicrobiens naturels puisque l'utilisation de ces combinaisons est stratégique pour contrôler les bactéries d'origine alimentaire et d'autres microorganismes pathogènes [7, 11-13].

Compte tenu de ce qui précède, l'objectif de cette seconde partie est d'examiner et mettre en évidence l'efficacité potentielle antimicrobienne, antifongique, antiplasmodiale et anticancéreuse des huiles des matrices natives individuelles des espèces *Aframomums*, aussi celles issues de la combinaison de leurs huiles (HE et HL), et de comprendre le type d'interactions et les mécanismes impliqués dans les activités biologiques de ces combinaisons.

II- PARTIE EXPERIMENTALE

II-1. Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique

II-1.1. Origine et identification des bactéries

Trois souches bactériennes et une fongique ont été sélectionnées comme candidates pour la réalisation des tests antimicrobiens [14].

- Bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*. (*souches sauvages*).
- Champignons : *Candida albicans* (*souche sauvage*).

Ces germes pathogènes proviennent du Laboratoire national de santé publique de Brazzaville.

Tableau IV.5 : Identification des bactéries.

Bactérie	Coloration de Gram	Type de Gram	
Souche sauvage (prélèvement)			
<i>Escherichia coli</i>	Rose	Bacille	Gram (-)
<i>Klebsiella pneumonia</i>		Bacille	Gram (-)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Violette	Cocci	Gram (+)

II-1.2.Préparation des milieux de culture

a) Gélose de Mueller Hinton

38 g de poudre ont été dissous dans un litre d'eau distillée puis chauffés jusqu'à la dissolution complète. La solution obtenue est stérilisée à l'autoclave à 121° C pendant 15 minutes. Après refroidissement, la solution est transférée dans des boites de Pétri.

b) Gélose Mannitol Salt

Le milieu est préparé avec 111 g de poudre de gélose dans 1 litre d'eau distillée. Le mélange est agité jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène et chauffé sous agitation jusqu'à dissolution complète. Le milieu ainsi préparé est stérilisé à l'autoclave à la température de 121° C pendant 15 mn. Après refroidissement, la solution est transférée dans des boites de Pétri.

c) Gélose Eosin Méthylène Bleue

37,5 g de poudre sont dissous dans un litre d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition avec agitation pour mieux dissoudre la gélose, puis stérilisé à l'autoclave à la température de 121° C. Après refroidissement, la solution est transférée dans les boites de Pétri.

d) Gélose Sabouraud

65 g de poudre de gélose Sabouraud sont dissous dans 1 litre d'eau distillée. Le mélange est successivement laissé 5 mn au repos, agité afin d'obtenir une suspension homogène, puis Chauffé avec agitation jusqu'à dissolution complète. Le milieu ainsi préparé est stérilisé à l'autoclave à la température de 121° C pendant 15 mn.

e) Isolement des colonies

Pour l'isolement des colonies, nous avons utilisé les milieux de culture suivants : la gélose Mannitol Salt pour les staphylocoques aureus (colonies jaunes), la gélose Eosin Méthylène Bleue pour les Escherichia coli (colonies brillants) et gélose Mueller Hinton (MH) pour l'antibiogramme, la gélose Sabouraud pour les levures (*Candida albicans*).

II-1.3.Préparation de la suspension bactérienne

Des colonies bien isolées issues des cultures sont mises chacune en suspension dans 10 ml d'eau distillée. 2 ml de chaque suspension sont coulés sur de la gélose de Mueller Hinton et sur la gélose de Sabouraud.

II-1.4. Préparation des solutions à tester

Le matériel végétal est constitué des extraits d'huile essentielle de graines et coques des fruits *A. stipulatum* et *A. giganteum*.

Les médicaments de références sont : La gentamicine- CN (10 µg), la Lincomycine (MY), la Préfloxacine- PEF (10 µg), la Cephazoline- KZ (30 µg), le Chloramphénicol- C (30 µg) et la Streptomycine- S (10 µg).

II-1.5. Antibiogramme

Pour évaluer l'activité antimicrobienne, nous avons utilisé la technique de diffusion en milieu solide [15]. On dépose à la surface sur les milieux de gélose (Mueller Hinton (MH) et Sabouraud) préalablementensemencée de germe-tests, des disques de papier filtre de 6 mm imprégnés des extraits de différentes concentrations (5 µL de dépôt de la solution préparée), soit une dose de 200 µg des extraits par disque.

Après 24 heures d'incubation à 37° C à l'étuve, on observe l'apparition d'une zone claire autour des disques n'ayant pas de colonies microbiennes, appelée zone d'inhibition. L'effet antimicrobien recherché est proportionnel au diamètre d'inhibition mesuré.

II-2. Evaluation de l'activité antiplasmodiale et cytotoxicité

II-2.1. Evaluation de l'activité antimalarique *in vitro*

Une souche de *Plasmodium falciparum* est utilisée dans ce travail ; la FcB1-Colombie, qui est chloroquine-résistante, à une valeur de CI₅₀ (concentration qui inhibe de 50% la croissance parasitaire) de la chloroquine de 186 nM. Le seuil de résistance à la chloroquine est de 100 nM. Le maintien en culture s'est fait suivant la technique de culture *in vitro* [16] avec quelques modifications [17-19]. Les parasites ont été maintenus *in vitro* dans les globules rouges humains (O±; EFS; Toulouse, France), les solutions mères d'extraits sont diluées avec 4% d'hématocrite dans le milieu de culture RPMI 1640 additionné avec 25 mM Hepes et du NaHCO₃ à 30 M et complété avec 7% sérum AB+ humain (EFS) [20].

Les tests sont réalisés sur des plaques à 96 puits remplis d'un volume fixe d'hématies parasitées (parasitémie de 1 % et hématocrite de 1,5 %). Les fractions à tester (à différentes concentrations) sont alors additionnées en triplicat dans les puits [20]. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, l'hypoxanthine tritiée est ajoutée à raison de 0,25 µCi/puits (Perkin-Elmer à 1 mCi/ml, France), et les plaques sont remises dans l'incubateur pendant 24 heures. A la fin du cycle, les plaques sont congelées à -20°C pour provoquer l'hémolyse des erythrocytes. Après décongélation, les acides nucléiques sont collectés sur un filtre à l'aide d'un collecteur de cellules automatique (Perkin Elmer, France). La radioactivité déposée sur le filtre (séché au micro-onde et enveloppé dans un plastique dans lequel sont ajoutés 4 mL de liquide de scintillation) (Betaplate Scint, Perkin Elmer) est alors mesurée par un compteur β (Microbeta Trilux, Perkin Elmer). L'activité antiplasmodiale de chaque extrait est représenté par la concentration à laquelle 50% de la croissance parasitaire est inhibée ; cette concentration est appelée IC₅₀ (concentration inhibant 50% de la croissance parasitaire). D'après la littérature, l'activité antiplasmodiale d'un échantillon (extrait ou composé) est très actif si IC₅₀ < 5 mg/L, actif si IC₅₀ entre 5 et 50 mg/L, faiblement actif si IC₅₀ entre 50 et 100 mg/L et inactif si IC₅₀ > 100 mg/L.

II-2.2. Test de cytotoxicité

La cytotoxicité des extraits a été estimée sur les cellules humaines du cancer du sein (MCF-7). Les cellules ont été cultivées dans les mêmes conditions comme ceux utilisés pour *Plasmodium falciparum*, à l'exception que les 10% du sérum humain ont été remplacé par 10% sérum de veau foetal (Lonza). La culture est ensemencée dans une plaque 96 puits à raison de 30 000 cellules par puits dans 100 µL de milieu. Les plaques sont mises dans l'incubateur (24 h à 37°C, à saturation de vapeur d'eau, 5% CO₂) [20]. L'hypoxantine tritiée est ajoutée à raison de 0,25 µCi/puits (Perkin Elmer à 1 mCi/mL, France), et les plaques sont remises dans l'incubateur pendant 24 heures de plus. A la fin du cycle, les plaques sont congelées à -20°C pour provoquer la lyse cellulaire. Après décongélation, les acides nucléiques sont collectés sur des filtres à l'aide d'un collecteur de cellules automatique (Perkin Elmer, France). La radioactivité déposée sur le filtre (séché au micro-onde et enveloppé dans un plastique dans lequel sont ajoutés 4 mL de liquide de scintillation)

(Betaplate Scint, Perkin Elmer) est alors mesurée par un compteur β (Microbeta Trilux, Perkin Elmer) [20, 21]. La CI_{50} est déterminée comme précédemment pour *P. falciparum*.

III- RESULTATS ET DISCUSSIONS

III-1. Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles

L'évaluation des activités microbiennes n'a été menée que sur les huiles essentielles des graines et coques de fruits des deux espèces *A. stipulatum* et *A. giganteum*. Les huiles essentielles des ces coques et graines ont été testées sur quatre souches cliniques. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés pour chaque disque imprégné. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV.6.

Tableau IV.6 : *Activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de coques de fruits et graines des fruits de *A. stipulatum* et de *A. giganteum* sur les souches cliniques.*

Huiles essentielles	Charge du disque (μl)	<i>Eschirichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
		Diamètre d'inhibition (mm)			
Graines <i>A. stipulatum</i>	5	-	11,0 \pm 2,0	-	9,0 \pm 2,0
Coques <i>A. stipulatum</i>	5	16,5 \pm 1,5	17,5 \pm 3,5	-	9,5 \pm 2,5
Graines <i>A. giganteum</i>	5	-	11,5 \pm 4,5	-	8,5 \pm 1,5
Coques <i>A. giganteum</i>	5	9,0 \pm 1,0	11,5 \pm 2,5	-	8,5 \pm 1,5
Antibiotiques					
Péfloxacine (PEF10)		19 (S)		25 (S)	-
Cephazoline (KZ30)		13 (R)		25 (S)	15 (S)
Lincomycine		10 (R)		-	-
Stréptomycine (S10)		15 (S)		12 (R)	-
Chloramphénicol (C30)		25 (S)		22 (S)	-
Gentamicine (CN10)		23 (R)		20 (R)	14 (R)

S : sensible ; R: résistant ; - : pas d'activité.

Les huiles essentielles des graines des deux espèces *Aframomums* ont été inactives sur la souche de *Escherichia coli*; tandis que, les huiles essentielles de coques ont présenté des zones d'inhibition avec un diamètre compris entre 15 et 18 mm pour *A. stipulatum* et des entre 8 et 10 mm pour les huiles de coques de *A. giganteum*.

Les huiles essentielles des graines et coques de ces espèces sont actives sur les souches de *K. pneumoniae*. Les diamètres d'inhibition sont compris entre 9 et 21 mm pour *A. stipulatum*: celles des huiles essentielles de graines se situant entre 9 à 13 mm et celles des huiles essentielles des coques se situant entre 14 à 21 mm. Les zones d'inhibition des huiles essentielles d'*A. giganteum* sont, quand à elles, comprises entre 7 et 16 mm avec une zone d'activité pour les huiles essentielles de coques se situant entre 9 et 14 mm. Les huiles essentielles de coques des fruits *A. stipulatum* et *A. giganteum* ont une activité supérieure à celle des graines sur la souche de *K. pneumoniae*.

Les diamètres d'inhibition de l'huile essentielle de coques du fruit *A. stipulatum* ont été bien supérieur à celle de l'huile essentielle de coques du fruit *A. giganteum* sur les deux souches de bactéries *E. coli* et *K. pneumoniae*.

Par contre, sur la souche clinique de *Staphylococcus aureus* toutes les huiles essentielles ont été inactives.

Les effets de l'huile de graines et coques des fruits *A. stipulatum* et *A. giganteum* sur *K. pneumoniae* et *S. aureus* sont similaire à ceux des huiles essentielles des feuilles de l'espèce *A. stipulatum* [22].

L'examen du tableau IV.6 montre que, pour le test antifongique, les huiles essentielles de graines et coques des fruits *A. stipulatum* et *A. giganteum* présente une activité sur *Candida albicans* avec des zones d'inhibition comprises entre 7 et 12 mm.

Il ressort de ces études menées sur les deux espèces que les huiles essentielles des coques de fruits ont une activité bactérienne et une activité antifongique supérieures à celles extraites des graines. Les huiles essentielles de coques de fruits des espèces du genre *Aframomum* présentent une inhibition supérieure aux composés de références (streptomycine, pénicilline et le chloramphénicol), bien que l'ensemble des résultats soit du même ordre de grandeur.

Les activités antibactériennes et antifongiques observées pour les huiles essentielles de deux espèces pourraient être attribuées aux composés monoterpéniques hydrocarbonés et oxygénés [23]. Il faut souligner que les huiles essentielles des deux organes ont des proportions assez élevées en 1,8-cinéole et β-pinène et à la présence de quelques composés minoritaires qui peuvent influencer cette activité biologique.

III-2. Activité antiplasmodiale des huiles essentielles et extraits lipidiques

Les résultats de cette première évaluation de l'activité anti-paludique par l'équipe partenaire de la Faculté de Pharmacie de Toulouse sont présentés dans le tableau IV.7. Des résultats intéressants ont été obtenus avec les extraits d'huiles essentielles de graines des fruits *A. stipulatum* et *A. giganteum*. Les valeurs de IC₅₀ sont respectivement égales à 4,2 µg/mL et 3,5 µg/mL alors que les valeurs modérées de IC₅₀ se situent à 30 µg/mL pour l'extrait lipidique de graines du fruit *A. giganteum* et à 33 mg/L pour l'extrait lipidique du fruit *A. stipulatum*.

Tableau IV.7 : Résultats de l'activité anti-malaria des extraits lipidiques et des huiles essentielles des graines du fruit *A. stipulatum* et *A. giganteum*.

Graines	IC ₅₀ µg/mL	
	FcB1	
	Lipides de réserves	Huiles essentielles
<i>A. stipulatum</i>	32,7 ± 0,7	4,2 ± 0,8
<i>A. giganteum</i>	31,7 ± 0,7	3,5 ± 0,6
Composé de référence		
chloroquine	0,1 ± 0,09	

La littérature fait état de l'usage de certains organes (feuilles, tiges) de plantes du genre *Aframomum* (*Aframomum melegueta*, *Aframomum latifolium*, *Aframomum scepturnum* et *Aframomum zambesiacum*) dans la composition des recettes traditionnelles pour le traitement de la malaria [24, 25]. Au Cameroun par exemple, la tige des *Aframomum* serait utilisée en infusion pour traiter la malaria [25]. Les études récentes montrent que l'activité antiplasmodique de certains *Aframomum* serait due à la présence des composés de la famille de Labdanes (diterpenoïdes) [26, 27]. Les valeurs de IC₅₀ liées à l'évaluation de l'activité antipaludique sont comprises entre 4 mg/L et 60 mg/L ; c'est ainsi que les composés tels que l'intermédeol, neo-intermedeol, identifiés dans les extraits d'huiles essentielles de la présence étude, sont à l'origine de cette activité.

Certains composés de référence utilisés comme la chloroquine présentent une IC₅₀ de 0,02 mg/L [24, 28]. La quinine, l'artémisinine, la chloroquine ont des valeurs de IC₅₀ respectives de 0,55 mg/L 0,01 mg/L et 0,03 mg/L [27].

Les résultats obtenus avec les extraits lipidiques des graines des fruits *A. stipulatum* et *A. giganteum* pour l'évaluation de l'activité anti-plasmodiale ou anti-malaria, sont intéressants et peuvent positionner ces plantes dans la médecine traditionnelle comme une alternative au traitement de la malaria clinique.

III-3. Evaluation de l'activité antiplasmodiale des extraits lipidiques

Les résultats de cette première évaluation de l'activité anti-paludisme par l'équipe de la Faculté de Pharmacie de Toulouse sont présentés dans le tableau IV.8.

Tableau IV.8 : Evaluation de l'activité anti-plasmodiale de l'huile du fruit *N. lappaceum*.

Extraits lipidiques	IC ₅₀ µg/mL
	FcB1
Huile <i>N. lappaceum</i>	> 100
Acides gras de l'huile <i>N. lappaceum</i>	83

Les échantillons des extraits d'huile (mélange triglycérides) et mélange d'acides gras de *N. lappaceum* obtenue par hydrolyse, présentent des valeurs de IC₅₀ faiblement supérieure 80 µg/mL et qui traduisent leur inefficacité pour lutter contre les souches sélectionnées pour le test anti-plasmodial.

III-4. Evaluation de l'activité antiplasmodiale des mélanges hétérogènes

Un mélange hétérogène (formulation) a été retenu et a fait l'objet d'une évaluation de l'activité antiplasmodiale. Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau IV.9. Cette activité a été menée dans les mêmes conditions que l'extrait d'huile essentielle seule sur une souche de *P. falciparum* (FcB1).

Tableau IV.9 : Evaluation des activités antiplasmodiale du mélange hétérogène à base de l’huile essentielle de graines du fruit *A. giganteum*. FcB1 : souche de chloroquinoresistante de *Plasmodium falciparum*.

Echantillons	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	FcB1
Huile essentielle de graines <i>A. giganteum</i>	3,5
Formulation F4	40

Cette formulation réalisée à base d’extract d’huile essentielle de graine du fruit *A. giganteum* a présenté des valeurs de IC₅₀ entre 40 et 60 $\mu\text{g/mL}$. La formulation F4 présente une activité modérée sur la souche chloroquinoresistante de *P. falciparum* pour une valeur de IC₅₀ de 40 $\mu\text{g/mL}$. Cette faible valeur de IC₅₀ comparée à celle de l’huile essentielle individuelle est 11 fois moins efficace. Ce résultat peut être expliqué par les exo-interactions entre l’huile essentielle et les autres constituants de la formulation conduisant ainsi à un antagonisme ce qui est en cohérence avec la faible activité antioxydante totale de cette formulation (F4) observée dans le cas des mélanges hétérogènes (voir partie 1).

III-5. Activité anticancéreuse des huiles essentielles

Le potentiel anticancéreux ou cytotoxique des extraits lipidiques et des huiles essentielles des graines des fruits de *A. stipulatum* et de *A. giganteum* a été évalué selon la méthode expliquée précédemment. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV.10 et comparés à quelques composés ou molécules de références : le taxol (IC₅₀ 1,27 $\mu\text{g/mL}$) et l’étoposide (IC₅₀ 47,6 $\mu\text{g/mL}$) [29].

Tableau IV.10 : Activité anticancereuse des extraits lipidiques et huiles essentielles des graines des fruits *A. stipulatum* et *A. gigantum*.

Graines	IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$	
	Lipides de réserves	MCF-7
<i>A. stipulatum</i>	2,9	24
<i>A. giganteum</i>	7,6	19

D'après les critères d'activité du NCI (*National Cancer Institute*), pour un extrait, une valeur de IC₅₀ comprise entre 50 et 100 µg/mL est considérée comme faiblement active ; modérément active s'il elle est comprise entre 49 et 10 u.g/mL et active lorsque les IC₅₀ sont inférieures à 10 µg/mL [29]. Il apparaît donc que les valeurs de IC₅₀ obtenus, respectivement 2,9 µg/mL et 7,6 µg /mL pour les extraits lipidiques des graines des fruits *A. stipulatum* et *A. giganteum*, révèlent une activité anticancéreuse très efficace, alors que cette activité est plus modérée pour l'huile essentielle de graines du fruit *A. stipulatum* (24 µg/mL) par rapport à celle de *A. giganteum* (19 µg/mL) sur la lignée MCF-7.

L'activité anticancéreuse des extraits lipidiques peuvent s'expliquer par un apport des fractions de phytostérols et de tocophérols. Des récentes études signalent que, outre les effets sur les maladies cardiovasculaires et leur pouvoir hypocholestérolémiant, les phytostérols auraient une action anticancéreuse [30].

L'activité anticancéreuse de ces huiles essentielles et des extraits lipidiques des graines de ces deux espèces du genre *Aframomum* n'a, à notre connaissance, jamais fait l'objet d'une étude. Il serait donc intéressant de poursuivre les recherches sur l'isolement et l'identification des constituants des extraits de lipides de réserves et des huiles essentielles de ces deux matrices, en vue de déterminer les fractions ou les composés responsables de l'activité anticancéreuse globale des extraits lipidiques (IC₅₀ entre 2 et 7 µg/mL contre MCF-7).

IV- CONCLUSION

Les tests biologiques effectués ont confirmé l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits lipidiques de ces deux espèces du genre *Aframomum* : *A. stipulatum* et *A. giganteum*. Tous les extraits aqueux et hydroéthanoliques des plantes sélectionnées présentent également une activité antioxydante.

Les résultats concernant les activités biologiques des huiles de graines de ces *Aframomums* ont révélés des effets très intéressants de par leurs activités antimalariale et anticancéreuse.

La richesse en composés mineurs (tocophérols, phytostérols et composés volatils ou aromatiques) des extraits lipidiques des graines et coques de fruits de ces espèces apporte à cette fraction de lipides de réserves un intérêt nutritionnel supplémentaire.

L'évaluation de l'activité anti-plasmodiale de l'huile du fruit *N. lappaceum* a montré que ces matrices n'ont pas grand influence sur cette activité.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Guenther E., *The Essential Oils*. van Nostrand Co ed. 1950, NY, USA: Inc.: New York.
2. Boyle W., *Spices and essential oils as preservatives*. Am. Perfum. Essent. Oil Rev, 1955. **66**: p. 25-28.
3. Guenther E., *The Essential Oils*. D. van Nostrand ed. 1948, NY, USA: Inc.: New York.
4. Pichersky E., Noel J.P., Dudareva N., *Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity*. Science, 2006. **311**: p. 808-811.
5. Koroch A., Juliani H.R., Zygaldo J.A., *Bioactivity of Essential Oils and Their Components*, in *Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, B. R.G., Editor. 2007, Springer Verlag: Berlin, Germany. p. 87-115.
6. Burt S., *Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in foods: A review*. Int. J. Food Microbiol, 2004. **94**: p. 223-253.
7. Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G., *Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils*. Int. J. Food Microbiol., 2002. **74**: p. 101-109.
8. Davidson P.M., Parish M.E., *Methods for testing the efficacy of food antimicrobials*. Food Technol., 1989. **43**: p. 148-155.
9. Mourey A., Canillac N., *Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers*. Food Control, 2002. **13**: p. 289-292.
10. Harris R., *Synergism in the essential oil world*. Int. J. Aromather, 2003. **12**: p. 179-186.
11. Karatzas A.K., Kets E.P.W., Smid E.J., Bennik M.H.J., *The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol, 2001. **90**: p. 463-469.
12. Santiesteban-Lopez A., Palou E., López-Malo A., *Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH*. J. Appl. Microbiol., 2007. **102**: p. 486-497.
13. Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P., *The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients*. Int. J. Food Microbiol, 2008. **124**: p. 91-97.
14. Sanou D.B., *Etude de l'activité antifongique sur le Candida albicans de cinq plantes médicinales du Mali*, in *Pharmacie*. 1997: Bamako. p. 84.
15. Vincent J.G., Vincent V.N., *Filter paper disk modifications of the Oxford cup penicillin determination*. Proc. soc. Exp. Biol. Med., 1944. **55**: p. 162 -164.

16. Trager W., Jensen J.B., *Human malarial parasites in continuous culture*. Science, 1976. **193**: p. 673 - 675.
17. Ndounga M., Fliniaux M.A., Carme B., *Activité Antipaludique d'extraits de feuilles de Cassia spectabilis et Entandrophragma angolense*. Pharm. Méd. Trad. Afr. , 1997. **9**: p. 109-121.
18. Desoubzanne D., Marcourt L., Raux R., Chevalley S., Dorin D., Doerig C., Valentin A., Ausseil F., Debitus C., *Alisiaquinones and Alisiaquinol, Dual Inhibitors of Plasmodium falciparum Enzyme Targets from a New Caledonian Deep Water Sponge*. J. Nat. Prod., 2008. **71**: p. 1189 - 1192.
19. Valentin A., Benoit-Vical F., Moulis C., Stanislas E., Mallie M., Fouraste I., Bastide J. M., *In Vitro Antimalarial Activity of Penduline, a Bisbenzylisoquinoline from Isopyrum thalictroides*. Antimicrob. Agents Chemother, 1997. **41**: p. 2305 - 2307.
20. Afoulous S., Ferhout H., Raoelison E.G., Alexis Valentin A., Moukarzel B., Couderc F., Jalloul Bouajila J., *Helichrysum gymnocephalum Essential Oil: Chemical Composition and Cytotoxic, Antimalarial and Antioxidant Activities, Attribution of the Activity Origin by Correlations*. Molecules 2011. **16**: p. 8273 - 8291.
21. Cachet N., Hoakwie F., Bertani S., Bourdy G., Deharo E., Stien D., Houel E., Gornitzka H., Filliaux J., Chevalley S., Valentin A., Jullian V., *Antimalarial Activity of Simalikalactone E, a New Quassinoïd from Quassia amara L. (Simaroubaceae)*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009. **53**(10): p. 4393 - 4398.
22. Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De BruyneT., N. Hermans, Totte' J., Pieters L., Vlietinck A.J., *Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo*. J. Ethnopharmacology, 2002. **79**: p. 213-220.
23. Zakarya D., Fkhi-Tetouani S., Hajji F., *Chemical composition- Antimicrobial activity relationship of Eucalyptus essential oils*. Plantes Médicinales et Phytothérapie, 1993. **26**: p. 331-339.
24. Ngemenya M.N., Akam T.M., Yong J.N., Tane P., Fanso-Free S.N.Y., Berzins K., Titanji V.P.K., *Antiplasmodial activities of some products from Turreanthus africanus (Meliaceae)*. African Journal of Health Sciences, 2006. **13**(1-2): p. 33-39.
25. Lekane-Tsobgou D., *Aframomum au service de la diversité naturelle et culturelle des terroirs Grassfields du Cameroun: enjeux de valorisation des produits culturels et gestion durable des bas-fonds et interfluves*. 2009: Paris. p. Colloque international.

26. Duker-Eshun G., J.J.W., Asomaning W.A., Oppong-Boachie F., Olsen C.E., Christensen S.B., *Antiplasmodial activity of labdanes from Aframomum latifolium and Aframomum sceptrum*. Planta Med, 2002. **68**(7): p. 642-644.
27. Kenmogne M., Prost E., Harakat D., Jacquier M.-J., Frédéric M., Sondengam L.B., Zèches M., Waffo-Téguo P., *Five labdane diterpenoids from the seeds of Aframomum zambesiacum*. Phytochemistry, 2006. **67**: p. 433-438.
28. Valdés A.F.-C., Martinez J.M., Lizama R.S., Gaiten Y.G., Rodriguez D.A., Payrol JuaJ.A., *In vitro Antimalarial activity and cytotoxicity of some selected cuban medicinal plants*. Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo, 2010. **52**(4): p. 197-201.
29. Boyd M.R., *The NCI in vitro anticancer drug discovery screen; concept, implementation and operation 1985-1995.*, in *Cancer Drug Discovery and Development*, T. Teicher BA (Humana Press, NJ), 2, Editor. 1997, Drug Development: Preclinical Screening, Clinical Trial and Approval. p. 23-42.
30. Ayerdi-Gotor A., *Étude des variations des teneurs et de la variabilité des compositions en tocophérols et en phytostérols dans les akènes et l'huile de tournesol (Helianthus annuus L.)*, in *Sciences des Agroressources*. 2008, Institut National Polytechnique de Toulouse: Toulouse. p. 196.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux de recherche entrepris dans le cadre de ce projet ont permis, dans un premier temps, de compléter les connaissances sur le potentiel phytochimique des graines et fruits de 4 plantes saisonnières de notre étude.

- Dans un deuxième temps, une mise en oeuvre des techniques chromatographiques a conduit: à l'identification des constituants des huiles essentielles des différentes parties des fruits de *Aframomum giganteum* et de *Aframomum stipulatum*. Les composants majeurs sont des monoterpènes (β -pinène, 1,8-cinéol, β -caryophillène) dans les graines et les monoterpenoïdes (β -pinène, 1,8-cieneol, linalool, limonène, α -terpineol) dans les coques de fruits ;
- à la détermination de la composition en acides gras des fruits des quatre plantes ; les composants majeurs étant les acides palmitique, oléique, linoléique et α linolénique ;
- à l'identification des constituants mineurs (phytostérols et tocopherols) de la fraction insaponifiable des extraits lipidiques.

L'analyse biochimique des fruits de *Nephelium lappaceum* L. du Congo a fait ressortir leur richesse en lipides, notamment en acide arachidique C20 :0 et acide 11-eicosénoïque C20:1 et les phytostérols. Ce sont des constituants fonctionnels d'intérêt nutritionnel et diététique. La peau du fruit de *S. mombin* présente une forte teneur en phytostérol par rapport à la pulpe et aux noyaux. La composition en phytostérols des différentes parties du fruit est marquée par le β -sitostérol. La présence d'un alcane C₃₁H₆₄ dans l'épicarpe du fruit à un fort taux confère à la fraction lipidique des caractéristiques de graisse ou de cire, ce qui peut offrir des possibilités pour une exploitation rationnelle pour son utilisation dans d'autres domaines.

Une autre partie importante de ce projet a été la synthèse des monoglycérides d'acides gras à longues chaînes de la série en C20 :0 et C20 :1 fournis par l'huile d'amande de *Nephelium lappaceum* L. L'originalité de la composition chimique résultante réside en la richesse en monoglycérides et diglycérides. La lipo-transformation offre la possibilité de générer de nouvelles matrices composées de mélanges de fortes teneurs en monoglycérides purs ou en diglycérides purs. De ce fait, une valeur ajoutée de cette matrice lipidique recomposée a été révélée au laboratoire par les études de leurs propriétés physico-chimiques bien meilleures que les acides gras et les triglycérides.

L'huile de *Nephelium lappaceum* L. présente aussi des teneurs en phytostérols autour de 295 mg.kg⁻¹. Elle est caractérisée par la présence de Δ7-stigmastérol et Δ7-stigmastanol.

D'autre part, le potentiel pharmacologique des huiles essentielles de fruits de *Aframomum giganteum* et de *Aframomum stipulatum*, a été mis en évidence. Lors du criblage biologique réalisé sur les huiles essentielles de ces *Aframomum*, celle issue des graines de *Aframomum giganteum* s'est distinguée par son activité anti-plasmodiale et son activité cytotoxique sur les lignées cancéreuses (CMF-7). Ces activités sur ces huiles essentielles de graine et coques de fruits de ces *Aframomum* n'avaient jamais jusque là fait l'objet d'étude bien que la composition chimique des huiles essentielles des graines de ces deux *Aframomum* soit déjà connue.

Enfin, le criblage biologique a également permis de mettre en évidence l'activité antiplasmodiale et anticancéreuse des extraits lipidiques des graines de *Aframomum stipulatum* et *Aframomum giganteum*. Ces huiles fixes n'avaient auparavant fait l'objet d'aucune étude chimique et pharmacologique. Ces résultats obtenus sur les effets biologiques en relation avec les composants majeurs et mineurs de ces différentes matrices végétales natives ou reconstitués feront l'objet de publications scientifiques.

Les résultats obtenus mettent bien en évidence un apport en synergie du potentiel chimique des lipides de réserves et des huiles essentielles issus des fruits des espèces *Aframomum stipulatum* et *Aframomum giganteum* dont la phytochimie et le potentiel pharmacologique ne sont encore pas bien clairement établis. Ils ouvrent d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir sur leur connaissance structurale, formulation et utilisation.

En ce qui concerne les études de synergie, ces résultats préliminaires ont été acquis par des tests biologiques réalisés à partir des extraits de source des huiles essentielles et des lipides de réserve. Nous avons tenté d'étudier les matrices seules ou en mélange dans chacune des familles des huiles essentielles des lipides de réserve. La synergie des effets chimiques et biologiques est révélée dans le « bulk ». Nous observons par ailleurs, un effet antagoniste lorsque les extraits à activité biologique (activités antioxydantes) sont formulés en présence des agents de complexation. Nous pensons que cette approche confirme la preuve du concept c'est-à-dire la synergie des effets chimiques et biologiques. En perspective, il serait souhaitable de confronter ces résultats de cette approche d'études d'effets chimiques et biologiques « dans la masse » par rapport à une approche moléculaire qui ciblerait les constituants majeurs et mineurs fractionnés afin d'étudier leur activité biologique individuellement.

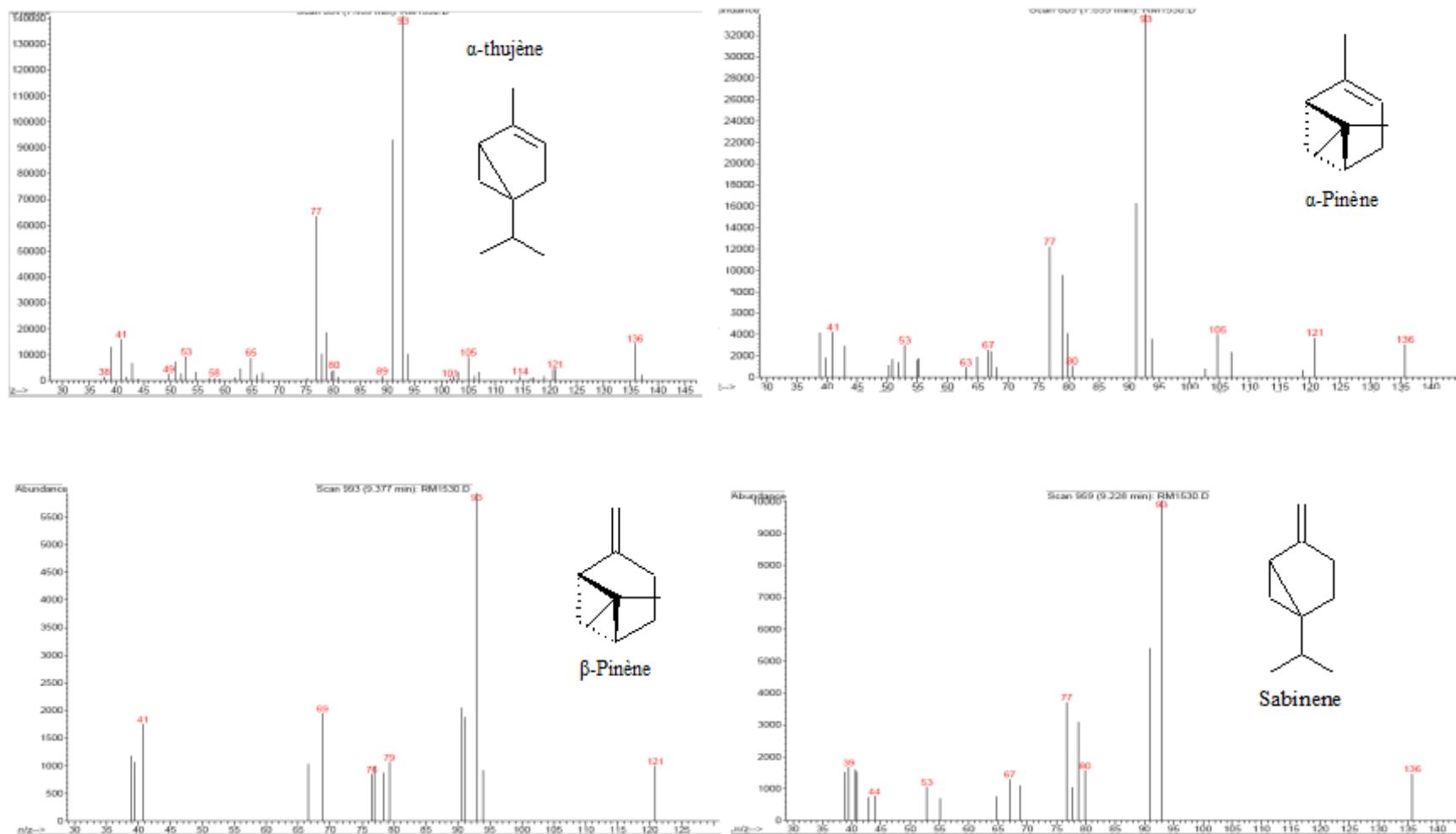
La complexation des huiles essentielles de graines de *Aframomum giganteum* apparaît comme un moyen pour préserver les arômes de cette graine et faciliter son incorporation dans les produits alimentaires, cosmétiques et même pharmaceutiques.

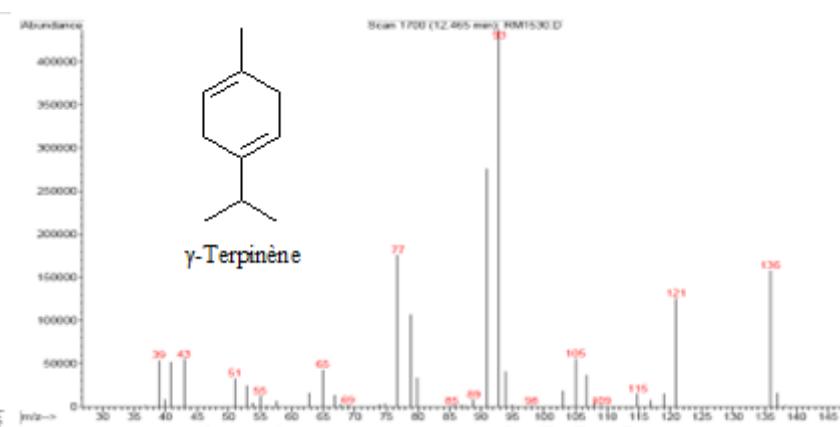
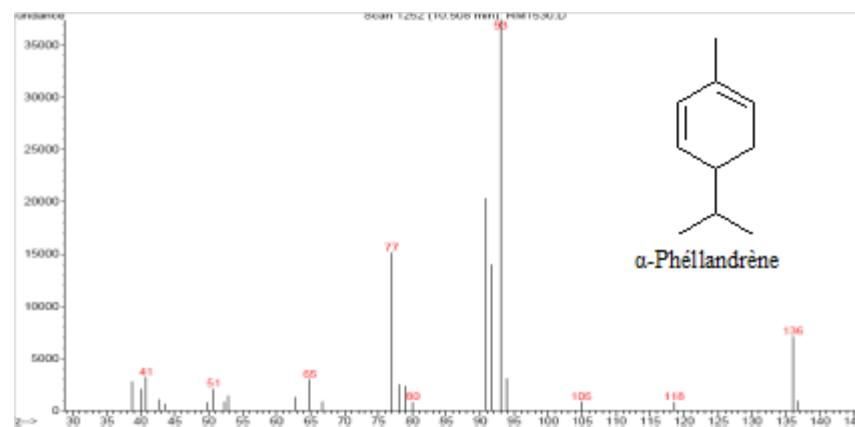
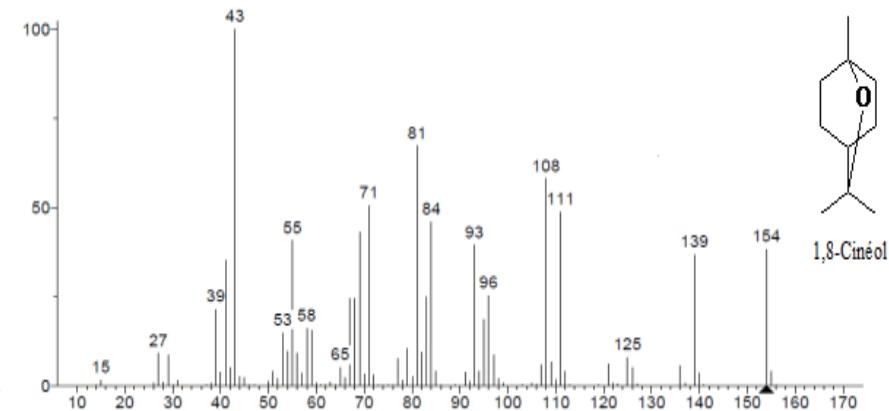
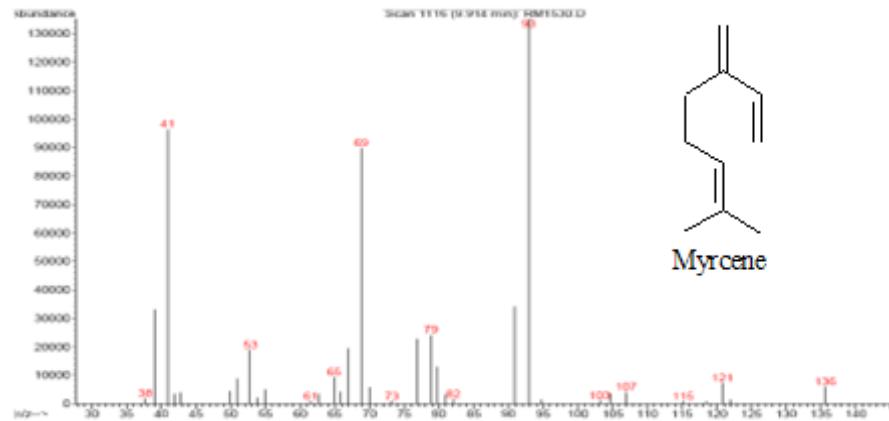
Nous valorisons ainsi la biodiversité des lipides de réserve découverts chez ces végétaux les « Aroma-Tinco-Oils Crops Resources ». Ce sont des agroressources pour les sciences de la vie fournissant à la fois des huiles de réserve et des métabolites secondaires que sont les huiles essentielles. Ce ne sont pas des sources de lipides industriels. Nous revendiquons des lipides de réserves inhabituels de haute fonctionnalité biologique. Ce qui augure l'exploitation des «graines de bouche » bioactives en nutrition et santé, aromathérapie et bien-être et en traitement des maladies endémiques (paludisme).

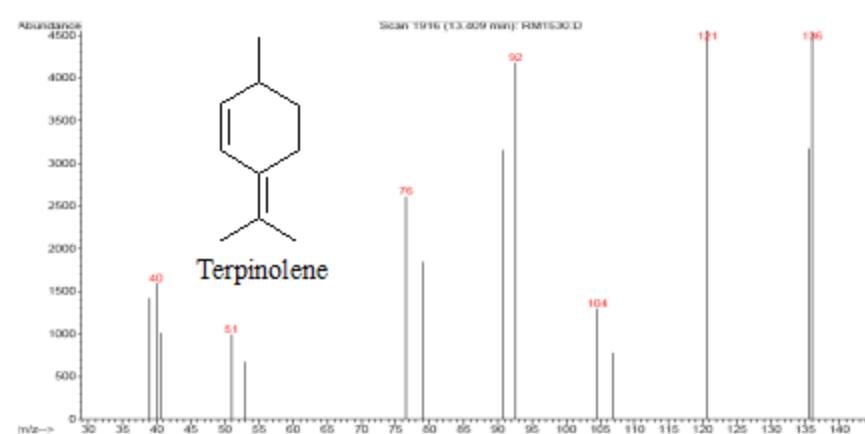
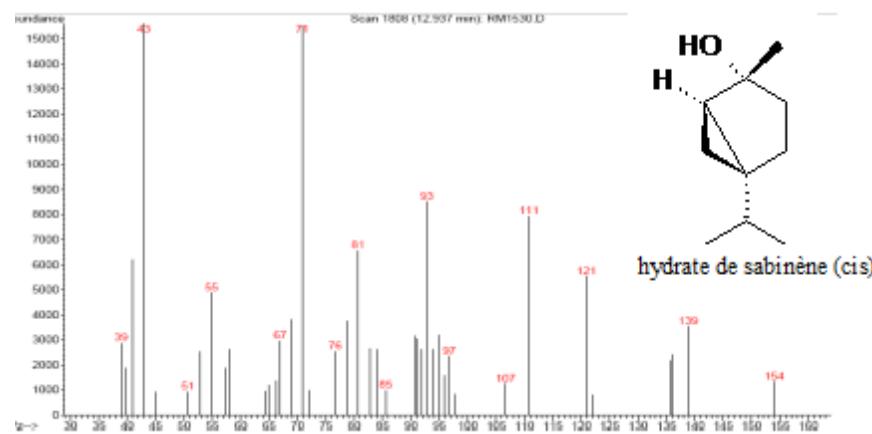
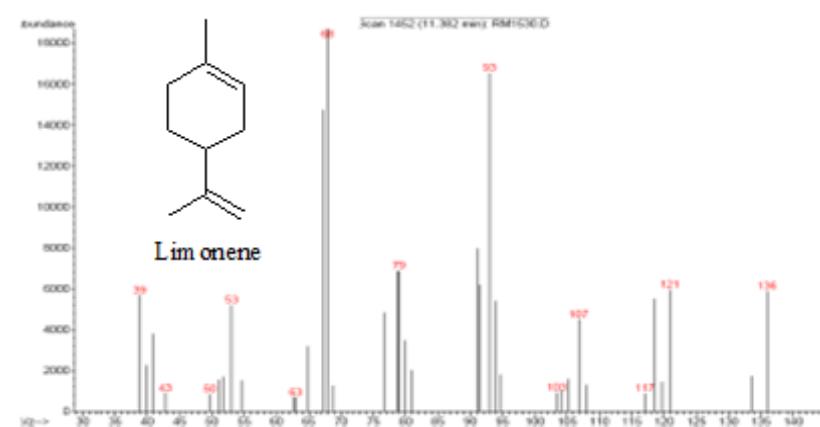
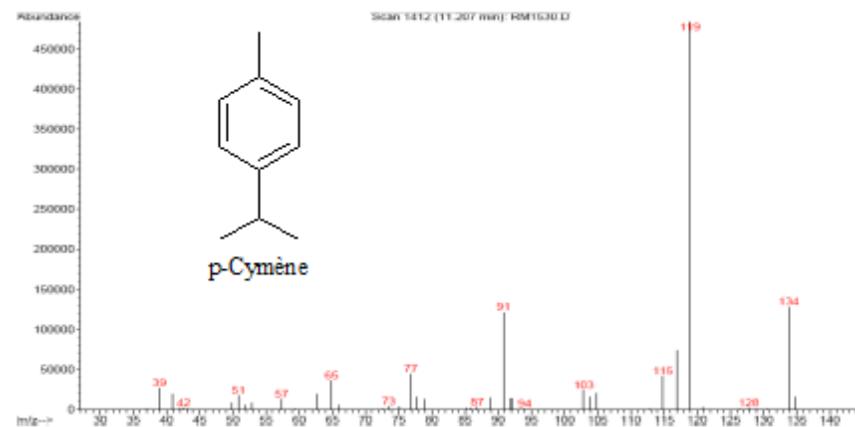
A l'issue de cette première étude, des questions stratégiques d'ordre scientifique, technologique et de mise en formulation se posent. Il est légitime de se demander comment réaliser la mobilisation, le transfert et la libération séquencés de ces deux familles (les huiles essentielles et les lipides de réserve) à partir du même organe. Faut-il privilégier la formulation de mélanges des deux familles chimiques ou cibler des synergies d'effets biologiques par structure chimique, fonctionnalité entre les individus de chaque famille ou par croisement des individus à l'intérieur et à l'extérieur de chaque famille. Les résultats attendus devraient permettre d'élargir le spectre d'études des relations structures chimiques/ propriétés/ performances biologiques et contribuer à formuler et à consommer ces matrices alimentaires.

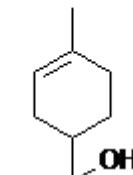
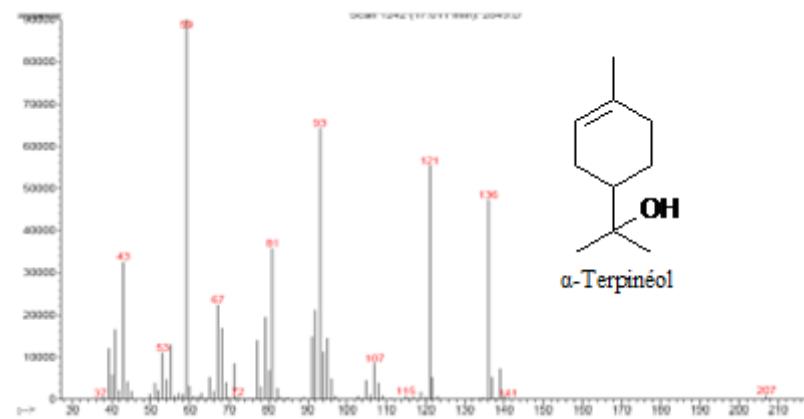
ANNEXES

Annexe 1 : Spectres de masses de quelques composés identifiés dans les huiles essentielles de *Aframomum stipulatum* (Gagnep) K. Schum et de *Aframomum giganteum* (Oliv.& hanb) K. Schum

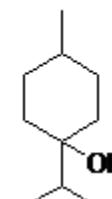
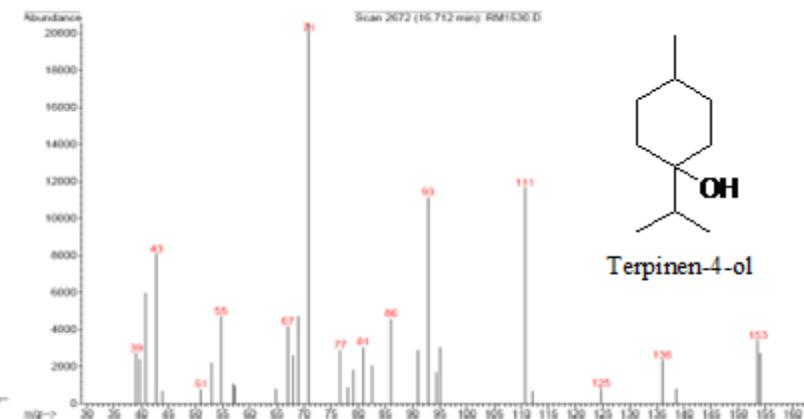




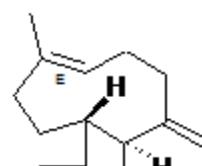
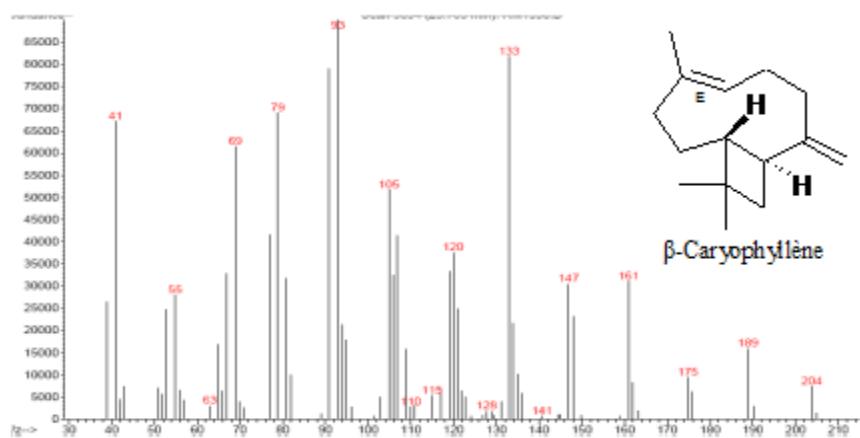




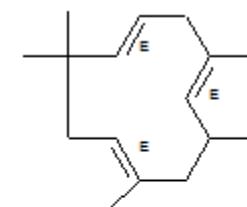
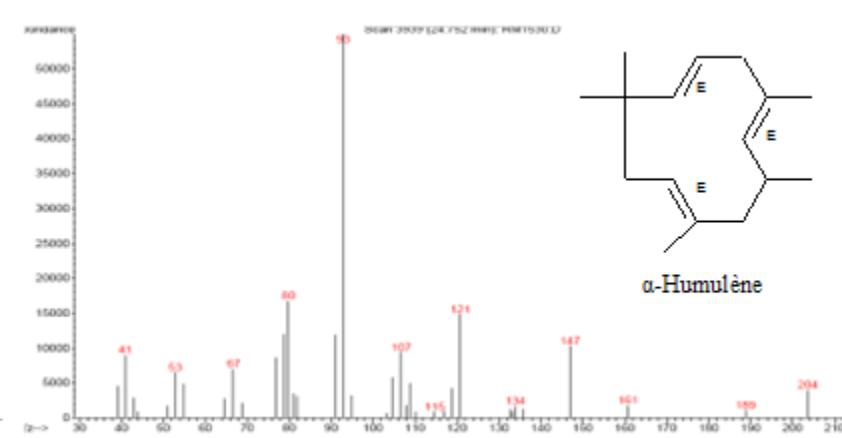
α -Terpinéol



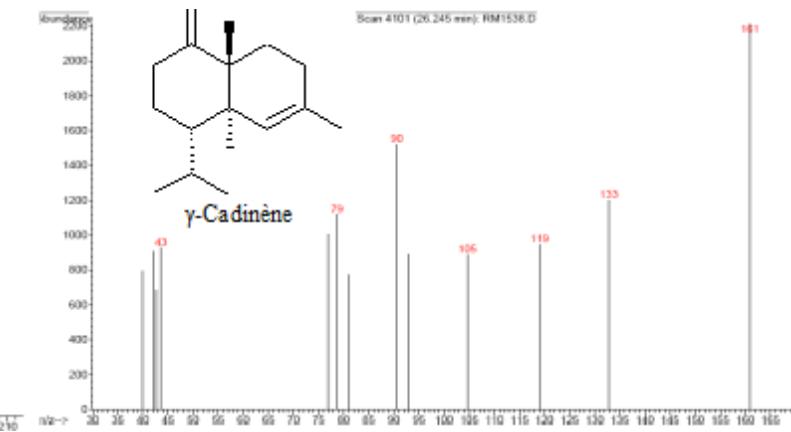
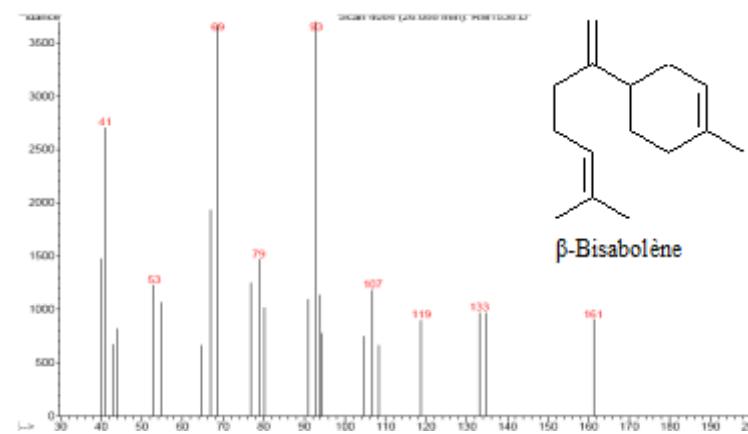
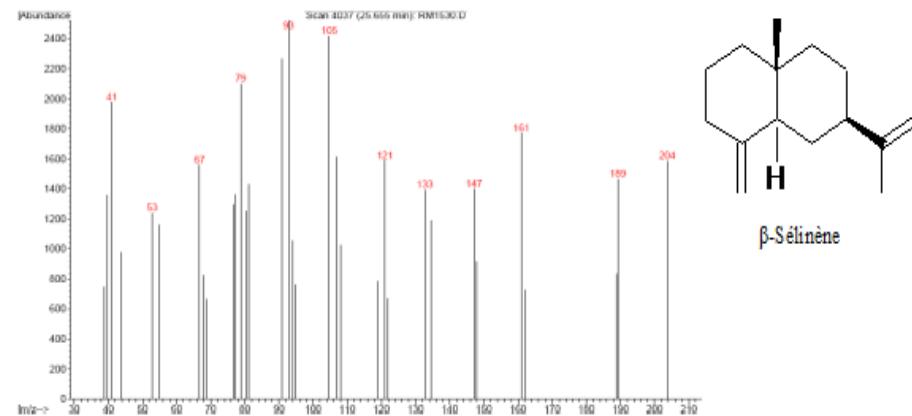
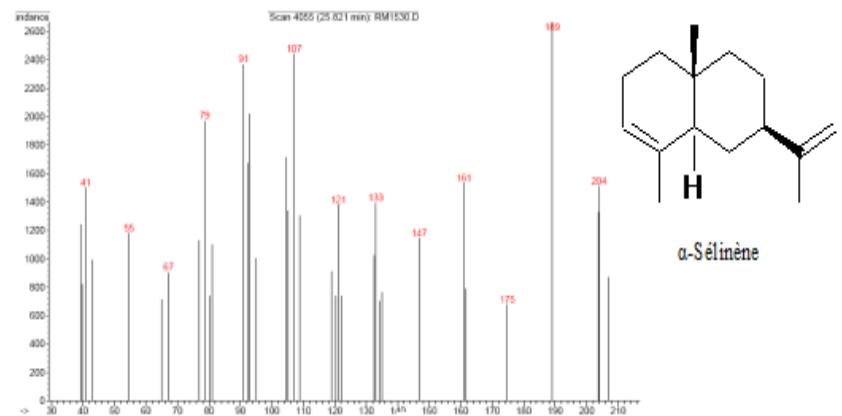
Terpinen-4-ol

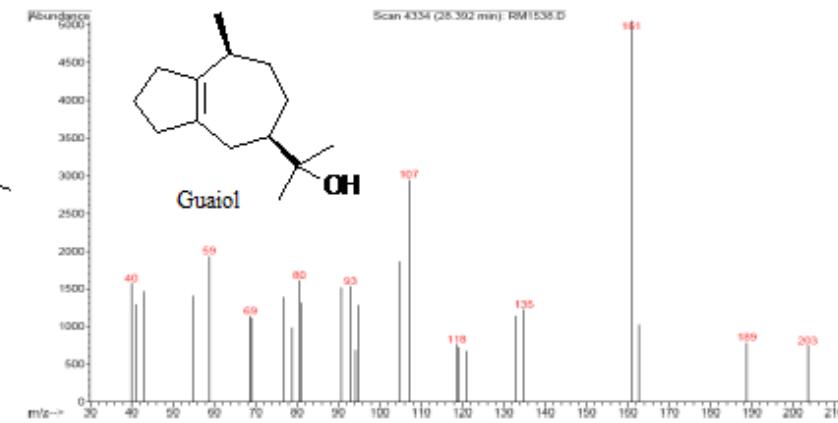
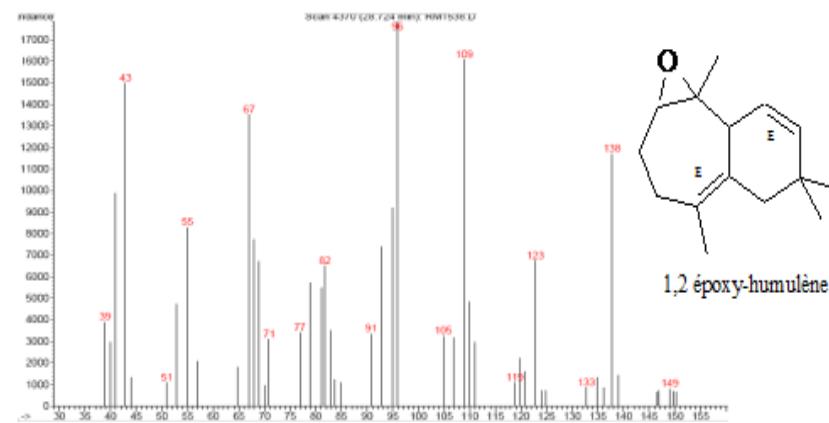
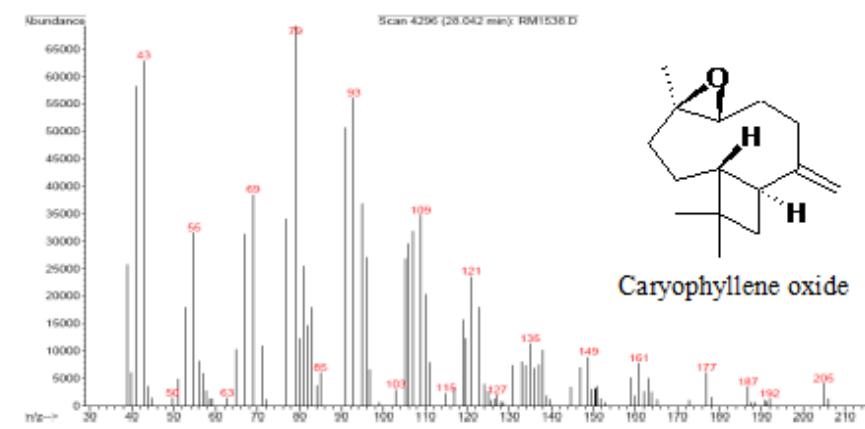
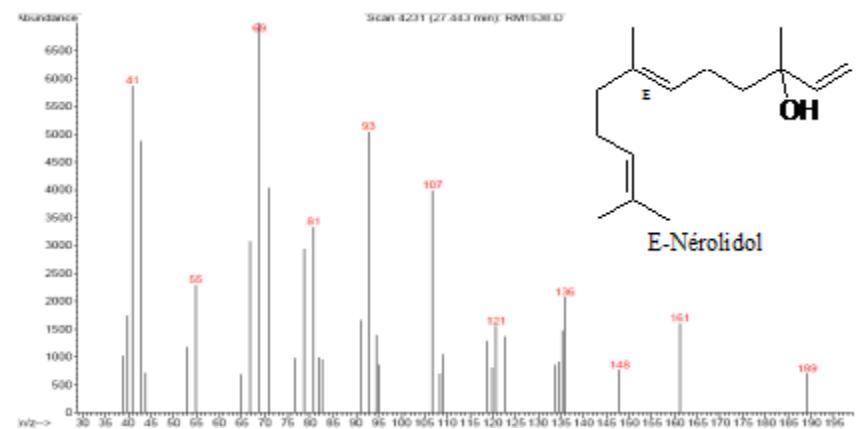


β -Caryophyllène

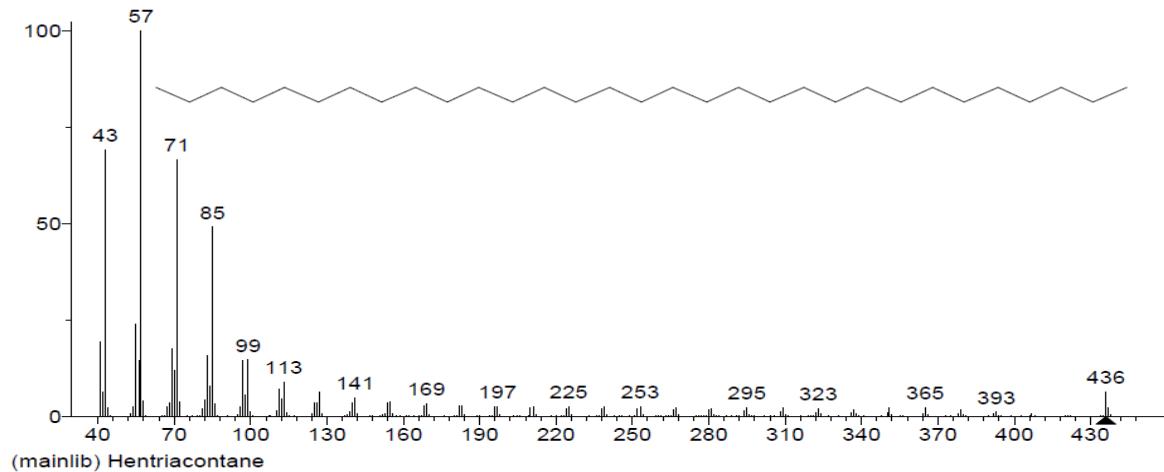


α -Humulène





Annexe 2 : Structures des molécules et spectres de masse des molécules silylées.



Name: Hentriacontane

Formula: C₃₁H₆₄

MW: 436 CAS#: 630-04-6 NIST#: 211723 ID#: 19904 DB: mainlib

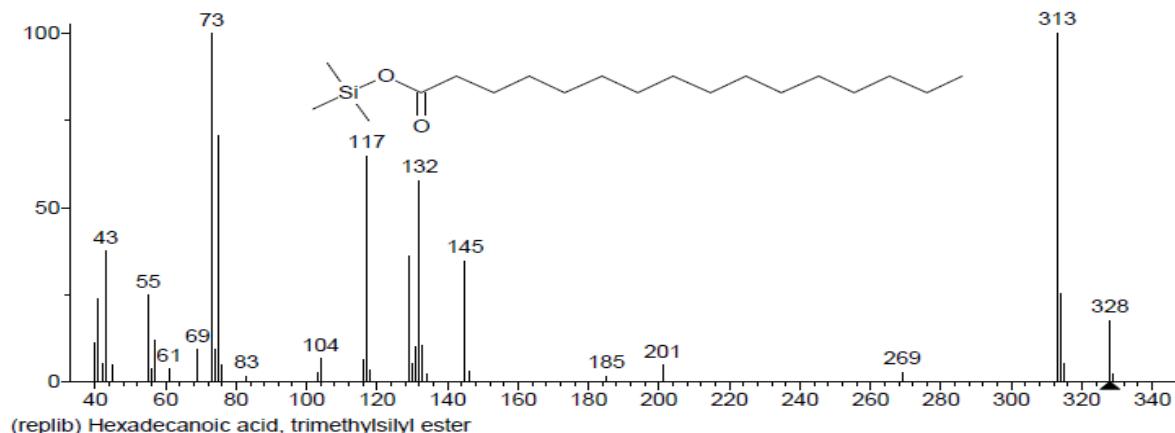
Other DBs: None

Contributor: LAC, NIDDK, NIH, Bethesda, MD 20892

10 largest peaks:

57 999	43 691	71 665	85 491	55 239
41 194	69 176	83 158	99 147	56 145

Spectre 1: Spectre de masse de l' hentriacontane (C₃₁H₆₄)



Name: Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester

Formula: C₁₉H₄₀O₂Si

MW: 328 CAS#: 55520-89-3 NIST#: 24244 ID#: 27103 DB: replib

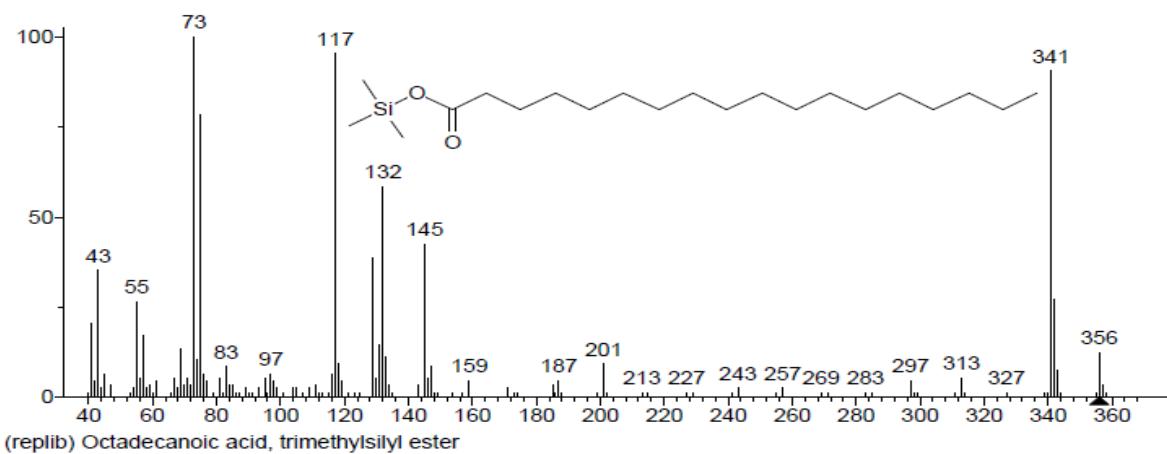
Other DBs: None

Contributor: S. MARKEY UNIV. OF COLO. MED. CTR., DENVER, COLORADO, USA

10 largest peaks:

313 999	73 997	75 706	117 646	132 575	43 374	129 360	145 345	314 250	55 247
---------	--------	--------	---------	---------	--------	---------	---------	---------	--------

Spectre 2: Spectre de masse acide gras palmitique silylé (C16 :0)



Name: Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester

Formula: C₂₁H₄₄O₂Si

MW: 356 CAS#: 18748-91-9 NIST#: 71613 ID#: 8718 DB: replib

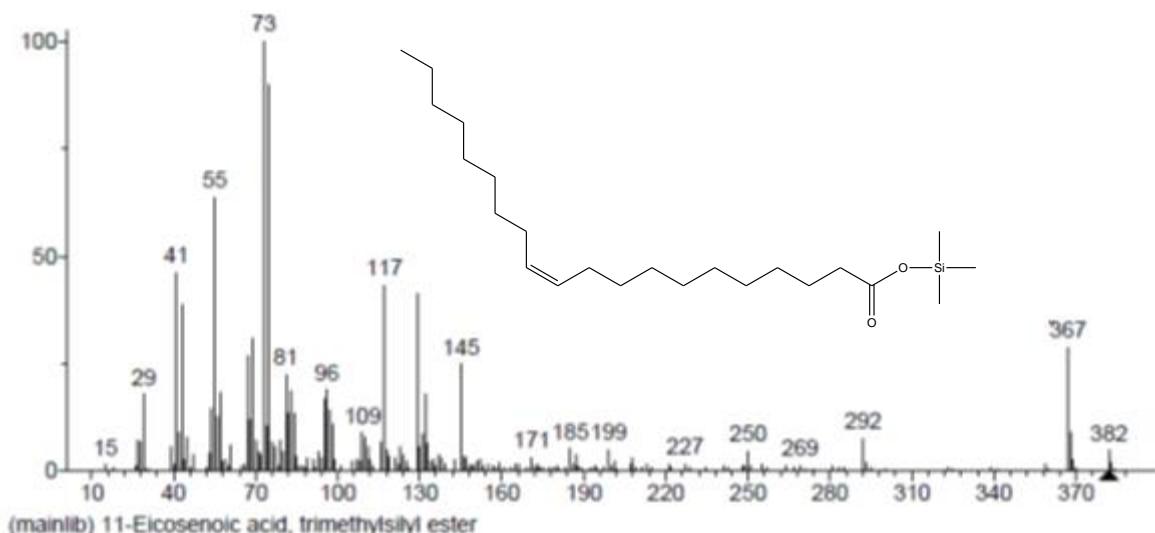
Other DBs: None

Contributor: G.S. KING, CHEM. PATHOL. DEP., QUEEN CHARLOTTE'S HOSP., LONDON,

10 largest peaks:

73 999 | 117 952 | 341 904 | 75 784 | 132 584 | 145 424 | 129 384 | 43 352 | 342 272 | 55 264 |

Spectre 3: Spectre de masse acide gras stéarique silylé (C18 :0)



Name: 11-Eicosenoic acid, trimethylsilyl ester

Formula: C₂₃H₄₆O₂Si

MW: 382 CAS#: N/A NIST#: 79040 ID#: 31203 DB: mainlib

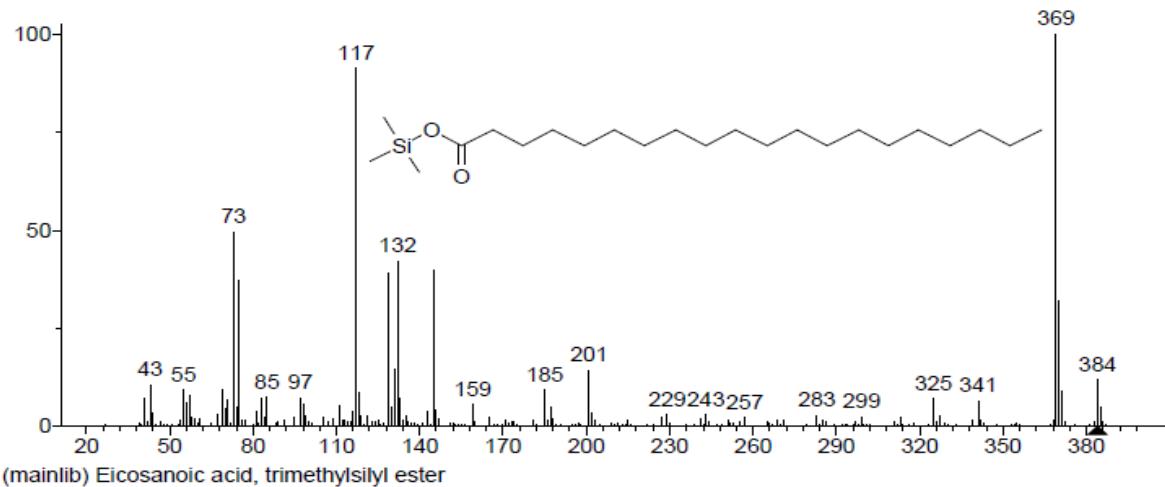
Other DBs: None

Contributor: O A MAMER, MCGILL UNIVERSITY, MONTRE

10 largest peaks:

73 999 | 75 898 | 55 636 | 41 460 | 117 432 | 129 410 | 43 385 | 69 306 | 367 287 | 67 267 |

Spectre 4: Spectre de masse acide gras gadoléique silylé (C20 :1)



Name: Eicosanoic acid, trimethylsilyl ester

Formula: C₂₃H₄₈O₂Si

MW: 384 CAS#: 55530-70-6 NIST#: 160953 ID#: 142912 DB: mainlib

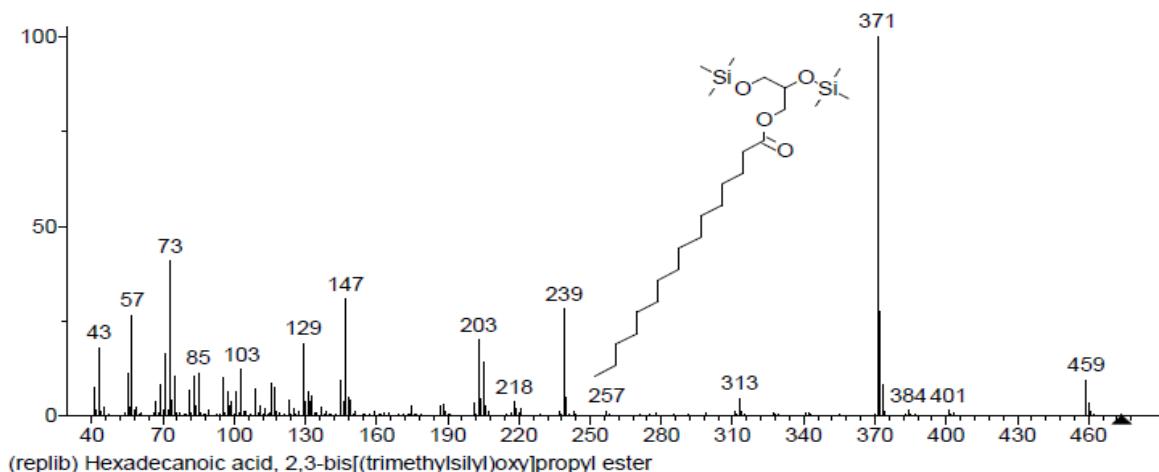
Other DBs: None

Contributor: Chemical Concepts

10 largest peaks:

369 999 | 117 911 | 73 494 | 132 420 | 145 397 | 129 390 | 75 372 | 370 319 | 131 144 | 201 142 |

Spectre 5: Spectre de masse acide arachidique silylé (C₂₀ :0)



Name: Hexadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester

Formula: C₂₅H₅₄O₄Si₂

MW: 474 CAS#: 1188-74-5 NIST#: 153633 ID#: 27501 DB: replib

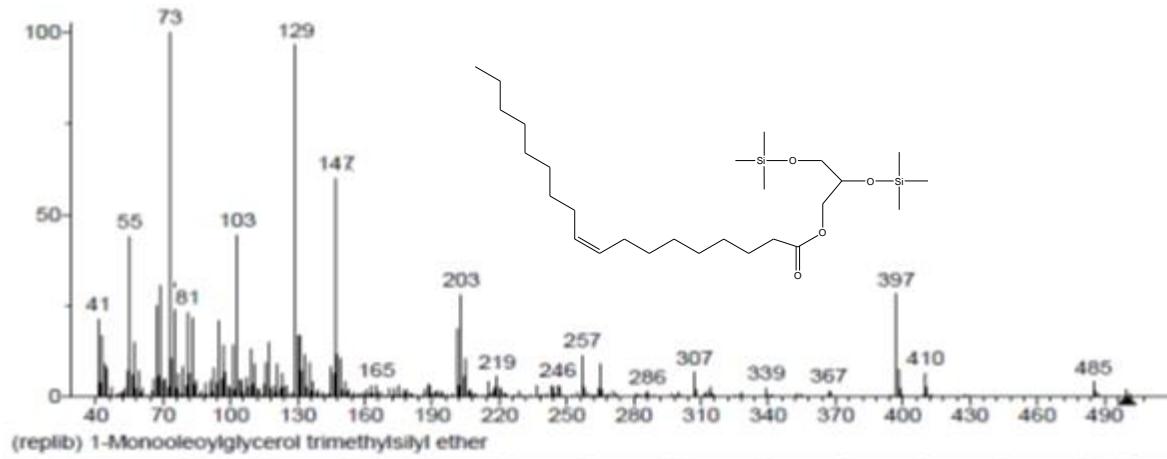
Other DBs: None

Contributor: Chemical Concepts

10 largest peaks:

371 999 | 73 407 | 147 307 | 239 280 | 372 275 | 57 263 | 203 200 | 129 190 | 43 178 | 71 162 |

Spectre 6: Spectre de l'α-monopalmitate de glycérol silylé(MG-C₁₆ :0)



Name: 1-Monooleoylglycerol trimethylsilyl ether

Formula: C₂₇H₅₆O₄Si₂

MW: 500 CAS#: 54284-47-8 NIST#: 153098 ID#: 8726 DB: replib

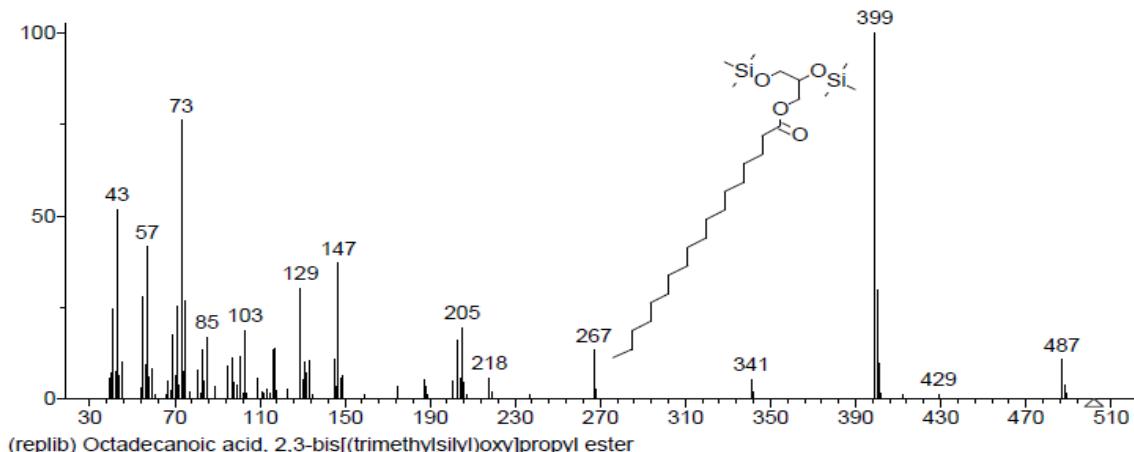
Other DBs: None

Contributor: Chemical Concepts

10 largest peaks:

73 999 | 129 963 | 147 597 | 103 443 | 55 439 | 75 311 | 69 302 | 397 281 | 203 279 | 67 249 |

Spectre 7: Spectre de masse de l'*a*-monooléate de glycérool silyle (C₁₈ : 1)



Name: Octadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester

Formula: C₂₇H₅₈O₄Si₂

MW: 502 CAS#: 1188-75-6 NIST#: 18150 ID#: 27612 DB: replib

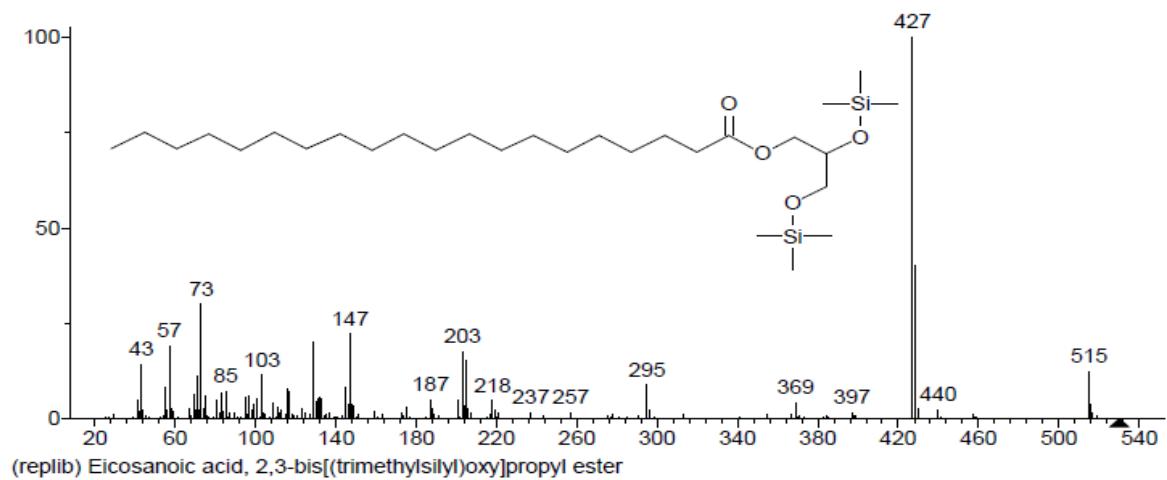
Other DBs: None

Contributor: S. MARKEY UNHV. OF COLO. MED. CTR., DENVER, COLORADO, USA

10 largest peaks:

399 999 | 73 759 | 43 517 | 57 415 | 147 369 | 129 300 | 400 298 | 55 278 | 75 267 | 71 250 |

Spectre 8: Spectre de masse l'*a*-monostéarate de glycérool silyle (MG-C₁₈ : 0)



Name: Eicosanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester

Formula: C₂₉H₆₂O₄Si₂

MW: 530 CAS#: 55517-94-7 NIST#: 153825 ID#: 27665 DB: replib

Other DBs: None

Contributor: Chemical Concepts

10 largest peaks:

427 999 | 428 399 | 73 299 | 147 221 | 129 198 | 57 190 | 203 176 | 205 151 | 43 142 | 515 123 |

Spectre 9: Spectre de masse l'*α*-mon-arachidate de glycérol silylé (MG-C₂₀ :0)

Aframomum stipulatum (Gagnep) K. Schum and *Aframomum giganteum* (Oliv. & Hanb) K. Schum as Aroma Tincto Oleo Crops resources: essential oil, fatty acids, sterols, tocopherols, and tocotrienols composition of different fruit parts of Congo varieties

Adolphe Christian Ngakegni-Limbili,^{a,b} Bachar Zebib,^b Muriel Cerny,^b Gouolally Tsiba,^b Arnold Murphy Elouma Ndinga,^b Zéphirin Mouloungui^{a*} and Jean-Maurille Ouamba^b

Abstract

BACKGROUND: Today, few known plant species provide both an essential oil (EO) and a vegetable oil (VO). Seed and husk of two *Aframomum* species were investigated and compared in terms of EO, fatty acids, tocopherols, and tocotrienols.

RESULTS: EO yield reaches 15.3 g kg^{-1} in the seeds and 3.2 g kg^{-1} in the husks, while VO yield is 180.0 g kg^{-1} in the seeds and 25.0 g kg^{-1} in the husks. β -Pinene, 1,8-cineol, α -selinene, terpineol, menthol, myrtenal and β -caryophyllene are the major compounds of seed and husk EO. Fatty acid analysis of two *Aframomum* species shows that stearic, linoleic, and palmitic acids were the major compounds of VO. Total sterol contents reached 6.3 g kg^{-1} in seed VO and 8.5 g kg^{-1} in husk VO. An appreciable amount of tocopherols (0.82 g kg^{-1}) was found in seed VO.

CONCLUSION: The seed and husk oil of *A. stipulatum* and *A. giganteum* fruits are rich sources of many bioactive constituents such as fatty acids, sterols, tocopherols and tocotrienols. These tropical wild fruits can be considered as new Aroma Tincto Oleo Crops (ATOCl) resources that contain both EOs and VOs.

© 2012 Society of Chemical Industry

Keywords: *Aframomum*; Congo varieties; fruit parts; essential oil; fatty acids; sterols

INTRODUCTION

The Zingiberaceae are a tropical monocotyledon family, comprising about 1300 species, of which many produce essential oils, mainly in their rhizomes.¹ The species *Aframomum* is well known for its fruits with aromatic seeds and has important roles in indigenous medicine, or as species of flavoring agents.^{2,3} *Aframomum* species are tall herbaceous plants that reach 3–6 m. All parts of the plant are commonly found in tropical regions of Central Africa. They have a very intensive and characteristic odour. Natives use stems, leaves, seeds, and fruits for many purposes; in particular, the plant is known in indigenous medicine for its healing properties.⁴ In Congo, the juice or decoction of leaves is a generalorative syrup for cough and heart pains;⁵ moreover, the macerated rhizomes are used as a gargle for toothache, and their fresh juice is used as eye drops to cure conjunctivitis.⁶ These therapeutic properties and nutritional value of *Aframomum* species are ascribed to the presence of many bioactive compounds such as vegetable oil components and volatile compounds.

One of the most important factors in tropical fruits is the high amount of unsaturated fatty acid, in particular oleic acid, a useful compound in the production of many food products and the manufacture of fatty esters.

Among the other volatile oil components, phytosterols are considered one of the interesting components. This type of product

* Correspondence to: Zéphirin Mouloungui, Université de Toulouse - UPS Toulouse - INSA Toulouse, INSA/CET, 31310 Toulouse, France. E-mail: Zephirin.Mouloungui@insat.fr

^a Université de Toulouse - UPS 1515 Chemin Agro-Biotechnologie, INSA/CET, INPT, 31310 Toulouse, France. E-mail: Zephirin.Mouloungui@insat.fr

^b Institut des Sciences et de la Technologie de l'Université de Douala - Université d'Etat du Bénin, Bénin

L. INRA/UMR 4810 Bobo-Dioulasso - Laboratoire Biomédecine des Recherches Pharmaceutiques, Bénin, UMR 4810, Institut des Sciences Pharmaceutiques, CNRS Institut Pasteur, Paris

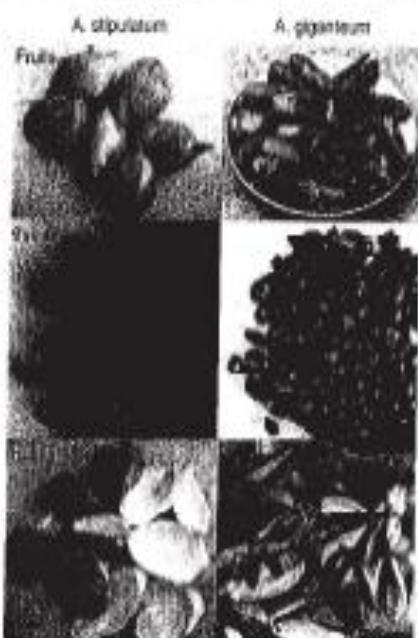


Figure 1. Photos of different parts of the studied fruits from Congo varieties.

plays a major role in several areas, namely in pharmaceuticals, production of therapeutic steroids, nutrition and cholesterol,⁷ additives in functional foods, antioxidant compounds,⁸ immunomodulating preparations⁹ and cosmetics creams. These uses have enhanced the search for new edible phytosterol sources.^{9–11}

Aframomum species have been the object of numerous chemical investigations.^{12–19} Most of these studies were focused only on the essential oil (EO) chemical profile of *Aframomum* species. No work has been undertaken concerning the volatile oil (VO) chemical profile of *Aframomum* species and, to our knowledge, no data exist concerning their fatty acid and sterol contents or their distribution in all fractions from different parts of the fruit.

The aim of this work was the determination and comparison of both VO and EO chemical profiles of different parts of *A. stipulatum* (Gagnep.) K. Schum and *A. giganteum* (Oliv. & Hanb.) K. Schum fruits.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Aframomum fruits (Fig. 1) were collected in September and January 2009 in two regions of Congo Republic: the region of Owando (north Congo) (latitude 00°29'12" N, longitude 15°54'20" E; altitude 326 m) and the region of Owando (south Congo) (latitude 4°47'12" S, longitude 14°37'44" E; altitude 595 m). After sampling, seeds were dried at 60 °C until constant weight was reached in order to determine their dry matter weight and moisture level. Seeds were separated from the fruits after manually splitting the husks. It is interesting to note that *A. stipulatum* and *A. giganteum* seeds constitute about 500 g kg⁻¹ of fruit dry matter weight. *A. giganteum* (Oliv. & Hanb.) K. Schum and *A. stipulatum* (Gagnep.) K. Schum have been authenticated and catalogued in the

herbarium of the Faculty of Pharmacy (Université Paul Sabatier, Toulouse) under the reference numbers Z.G. 2564F (2008) and Z.A. 251/F (2008) respectively.

Reagents and standards

All solvents used in our experiments, tetra-butyl methyl ether (TBME), *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl heptafluorobutyramide (MSHFBBA), acetic acid, chloroform, cyclohexane, ethanol and methanol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). The homologous series of C8–C22 *n*-alkanes used for identification were obtained from Sigma-Aldrich. The reagents trimethyl sulfonium hydroxide (TMSH), 1-methyl imidazole and potassium hydroxide were also purchased from Sigma-Aldrich.

Essential oil extraction

A 200 g fraction of air-dried and milled (MF10-IKA Microfine grinding mill, 0.5 mm sieve) of each fruit part was hydrodistilled separately for 6 h using a Clevenger-type apparatus. EO was dried with anhydrous sodium sulfate and stored at 4 °C in the dark.

Vegetable oil extraction

Fruit parts (husk and seed) from *A. stipulatum* and *A. giganteum* were milled with the MF10-IKA grinder and then extracted separately with cyclohexane in a Soxhlet apparatus. The extracts were then filtered and after evaporation of the solvent, under reduced pressure and elevated temperature the oil content was determined. The oil content is expressed as g kg⁻¹ of dry matter weight.

Fatty acid methylation

Before analysis by gas chromatography (GC), fatty acids (FAs) and their esters were transformed into their corresponding methyl esters (FAMEs) according to the procedure reported by Müller et al.²⁰ Twenty milligrams of oil were stabilized in 1 mL TBME, and then 100 µL of this solution was mixed with 50 µL TMSH solution (0.5 mol L⁻¹) in methanol.

Sterol extraction

Cholestanol (100 µg) used as internal standard and dissolved in chloroform was added to 140 mg oil. Then 3 mL of 1 mol L⁻¹ KOH in ethanol was added, mixed and heated at 75 °C for 30 min. After cooling to ambient temperature, 1 mL distilled water and 6 mL hexane were added to the mixture, followed by decantation and recovery of the hexane phase. The samples were then silylated by addition of 1 mL MSHFBBA mixed with 50 µL 1-methylimidazole and heating for 3 min at 100 °C. The silylated samples were then analysed by GC as described below.

High-performance liquid chromatography (HPLC) of tocopherols and tocotrienols

Tocopherol and tocotrienol contents in oil samples were determined by HPLC analysis, described in AFNOR NF ISO 9936. The apparatus consisted of a TSP AS 3000 liquid chromatograph coupled with an RF 3000 Diode array fluorescence detector set at an excitation wavelength at 290 nm and an emission wavelength of 330 nm and integrator. A 0.5 mL portion of 10 mg oil in 10 mL cyclohexane was injected for HPLC analysis using a Kromasil 100 Sil 5 µm column (250 mm, 4 mm). The mobile phase was isooctane-isopropanol (99.5:0.5, v/v) at a flow rate of 1.1 mL min⁻¹. A methanolic solution of each standard (0.1 mg mL⁻¹) was prepared.

Solutions were measured with a UV lamp detector. External calibration was carried out with dilutions of the stock solution with isooctane and isopropanol to have a range of concentration between 5 and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of each form. The contents of trisnorbornanes/isoconenes in the sample were obtained from an internal standard, by comparison of retention times with authentic standards.²¹

GC analysis of FAIs, saponins and volatile compounds

FA methyl esters (0.5 μL) from each sample were analysed by GC, using a flame ionization detector (FID) (Varian CP Select 3800 gas chromatograph, Grenoble, France), with a fused-silica capillary column, CP Select CB (25 m \times 0.32 mm, 0.50 μm film thickness). The carrier gas was helium with a flow rate of 1.2 mL min^{-1} , split ratio was 1:100. The initial oven temperature was held at 185 °C for 40 min, increased at a rate of 15 °C min^{-1} to 250 °C and then held there for 10 min. A second analysis was achieved on a DB Wax column (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm film thickness). The carrier gas was He with a flow rate of 1 mL min^{-1} . The initial oven temperature was held at 130 °C for 1 min, increased at a rate of 15 °C min^{-1} to 200 °C, followed by a rate of 2 °C min^{-1} to 250 °C and then held there for 15 min. The detector and injector temperatures were fixed at 250 °C. FAs were identified by comparison of their retention times with those of pure reference standards.

Saponin samples were analysed by GC using a PerkinElmer (Waltham, MA, USA) chromatograph equipped with an FID and a CP-SI-8CB capillary column (30 m \times 0.25 mm; 0.25 μm film thickness). The carrier gas was helium with a pressure of 100 kPa at the head of the column. Analyses were performed under the following temperature programme: isothermal at 160 °C for 0.5 min, from 160 to 260 °C at a rate of 20 °C min^{-1} , 2 °C min^{-1} to 300 °C and 45 °C min^{-1} to 350 °C. The analysis was performed using the following temperature injector programme: oven temperature isothermal at 55 °C for 0.5 min, at a rate of 20 °C min^{-1} until 400 °C for 10 min. Detector temperature was maintained at 365 °C.

GC-FID and GC-MS analysis of EO constituents

EOs were analysed by GC, using a Hewlett-Packard 6890 apparatus (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with an FID and electronic pressure control (EPC) injector. A polar HP Innowax (PEGI) column (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm film thickness) was used. The flow of the carrier gas (N₂) was 1 mL min^{-1} . The analysis was performed using the following temperature programme: oven temperature isothermal at 50 °C for 3 min, at a rate of 5 °C min^{-1} and isothermal at 300 °C for 3 min. Injector and detector temperatures were held, respectively, at 280 and 300 °C.

GC-MS analyses were performed on an HP 5890 II gas chromatograph interfaced with an HP 5973 mass spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with electron impact ionization (EI) at 70 eV. An HP-5 MS capillary column (60 m \times 0.25 mm, 0.25 μm film thickness) was used. The column temperature was programmed to rise from 40 to 280 °C at a rate of 5 °C min^{-1} . The carrier gas was He with a flow rate of 1.2 mL min^{-1} . Scan time and mass range were 1 s and 50–550 m/z, respectively. The injected volume was 1 μL and the total run time was approximately 63 min.

Identification of the EO constituents was based on a comparison of their retention indices relative to (C8–C22) n-alkanes with those of the literature or authentic compounds available in our laboratory. Further identification was made by matching their

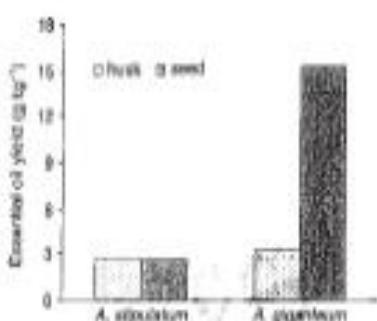


Figure 2. Essential oil yield (g kg^{-1}) of different parts of *A. stipulatum* and *A. giganteum* (a) (a) isothermal + SARTRE® replicates.

recorded spectra with those stored in the Wiley/NBS mass spectral library of the GC-MS data system and other published mass spectra.²² Quantitative data were obtained from the electronic integration of the RD peak area.

RESULTS AND DISCUSSION

EO and VO yields

The EO yields of seed and husk of *A. giganteum* and *A. stipulatum* are shown in Fig. 2. The seed of *A. giganteum* had the highest EO yield, at 13.3 g kg^{-1} , while 1.2 g kg^{-1} was observed in husks. The seed yielded approximately five times as much EO as the husks. *A. stipulatum* stipule/husk seeds and husks yielded the same amount of EO, at 2.6 g kg^{-1} . Agrawal et al.¹⁶ have studied EO yields of *A. giganteum* (babon variety) from leaves and rhizomes and found 5 and 2.7 g kg^{-1} , respectively. By comparison, EO yields from fruit parts of *A. giganteum* in this study are considerably higher than those extracted from leaves and rhizomes, suggesting that the accumulation of EO took place in the fruit, particularly the seed, which is the main organ of its biosynthesis.

The VO content of the seed was about 80 g kg^{-1} and 15 g kg^{-1} for the husks of *A. stipulatum*, compared to 180 g kg^{-1} and 34 g kg^{-1} , respectively, for the seeds and husks of *A. giganteum*.

Compared with other current ATOC resources^{17–19} (Table 1), *A. giganteum* has EO and VO yields similar to those of coriander, while EO and VO yields of *A. stipulatum* are comparable to those of fennel species.

EO composition

The EO composition from different parts of the fruit is reported in Table 2. Thirty-six and 31 constituents were identified in *A. stipulatum* seed and husk, which formed 97.7% and 96.6% of the total EO, respectively. *A. giganteum* contains 26 and 33 constituents in seed and husk which formed 100% and 99.8% of the total EO, respectively. β -Pinene (235.2 g kg^{-1}), linalool (188.0 g kg^{-1}), 1,8-cineole (266.5 g kg^{-1}), α -pinene (151.6 g kg^{-1}), and α -terpineol (122.1 g kg^{-1}) were the major compounds in the husk EO, while the major part of the seed EO is composed of α -pinene (428.2 g kg^{-1}), α -selinene (210.0 g kg^{-1}) and 1,8-cineole (170.2 g kg^{-1}).

The EO chemical composition of the seeds and husks differs. The EO obtained from seeds is dominated by hydrocarbon monoterpenes (514.0–4822.2 g kg^{-1}) and hydrocarbon sesquiterpenes (231.8–381.0 g kg^{-1}). The husk EO is characterized by a high content of oxygenated monoterpenes (469.5–560.7 g kg^{-1}).

Table 1. Various ATOC plant species yielding both essential oils (EO) and vegetable oils (VO) compared with *Aframomum stipulatum* and *A. giganteum* species studied in our work

Plant species	EO (g kg ⁻¹)	VO (g kg ⁻¹)	Main aromatic(s) g kg ⁻¹	Main fatty acids g kg ⁻¹	References
Cultivated apple (<i>Antron</i> regeneration)	1 ^a , 2 ^b	13 ^b	Benzal (178 ^b , 132 ^b –350 ^b) β - β -Caryophyllene (349 ^b) α -Phellandrene (119 ^b) δ -Eudamol (113 ^b , 140 ^b –199 ^b) Cinnamyl (255 ^b , 155 ^b –222 ^b) Limonene (20 ^b , 13 ^b –320 ^b) Terpinol (93 ^b , 240 ^b –860 ^b) Camphor (20 ^b , 30 ^b –76 ^b)	C16:0 (204 ^b) C18:1n-9 (162 ^b) C18:1n-6 (162 ^b)	23, 24
Cassava (<i>Cassia caesi</i> L.)	30 ^c –60 ^c	40 ^c –130 ^c	Cinnamyl (255 ^b , 155 ^b –222 ^b) Limonene (20 ^b , 13 ^b –320 ^b) Terpinol (93 ^b , 240 ^b –860 ^b) Camphor (20 ^b , 30 ^b –76 ^b)	C18:1n-9 (162 ^b –209 ^b) C18:2n-6 (101 ^b)	25, 26, 27
Coriander (<i>Coriandrum sativum</i>)	3.2 ^c , 6.8 ^c	142 ^c , 226 ^c	Terpinol (93 ^b , 240 ^b –860 ^b) Camphor (20 ^b , 30 ^b –76 ^b)	C18:1n-12 (187 ^b –768 ^b) (420 ^b –750 ^b) C18:2n-6 (130 ^b –150 ^b) (130 ^b –180 ^b)	28, 29
Fennel (<i>Foeniculum vulgare</i>)	4 ^c , 13 ^c	20 ^c –30 ^c	Terpinol (310 ^b) α -Phellandrene (117 ^b) Anethol (500–800 ^b)	C18:3n-3 (170 ^b –420 ^b) C18:2n-6 (210 ^b –400 ^b)	30, 31, 32, 33
Black currant (<i>Ampelocissus</i> sp.)	4 ^c –25 ^c	250 ^c –440 ^c	μ -Cymene (150 ^b) Durrumene (40 ^b) Caryophyllene (49 ^b)	C18:0 (189 ^b –140 ^b) C18:1n-9 (160 ^b –350 ^b) C18:3n-6 (420 ^b –700 ^b)	34, 35, 36
Karifi koots (<i>Utricularia</i> sp.)	2 ^c	210 ^c	β -Unguide (510 ^b) α -Terpinol (741 ^b)	C18:1n-12 (725 ^b) C18:2n-6 (190 ^b)	37, 38
<i>Aframomum</i> species				C16:0 (172 ^b , 277 ^b)	Our work
<i>Aframomum stipulatum</i> (<i>A. stipulatum</i> L.)	2.0 ^c , 2.6 ^c	15 ^c , 30 ^c	β -Pinene (235 ^b , 428 ^b) Terpinol-4-ol (122 ^b) 1,8-Cineol (35 ^b , 142 ^b) α -Terpineol (152 ^b) δ -Caryophyllene (51 ^b)	C18:1n-9 (162 ^b , 668 ^b) C18:2n-6 (31 ^b , 322 ^b)	
<i>Aframomum giganteum</i> (<i>Oliver & Hornibrook</i> Schlecht)	12 ^c , 15.3 ^c	261, 189 ^c	β -Pinene (140 ^b , 340 ^b) α -Goneane (165 ^b) 1,8-Cineol (170 ^b , 204 ^b) Myrcene (98 ^b) α -Terpinol (83 ^b)	C16:0 (227 ^b , 292 ^b) C18:1n-9 (271 ^b , 604 ^b) C18:2n-6 (441 ^b , 242 ^b)	Our work

^a From seed.^b From fruit.

followed by hydrocarbon monoterpenes (492.8–387.8 g kg⁻¹) for *A. stipulatum* and *A. giganteum*, respectively.

Seed EO of *A. stipulatum* is composed of 36 compounds, among which β -pinene (428.2 g kg⁻¹) and β -caryophyllene (31.7 g kg⁻¹) are the major compounds, while husk EO consisted of 31 compounds, among which β -pinene (235.2 g kg⁻¹), terpinol-4-ol (111.6 g kg⁻¹), 1,8-cineol (140.6 g kg⁻¹) and α -terpinol (122.1 g kg⁻¹) are the major compounds.

Seed EO of *A. giganteum* is composed of 28 compounds, among which β -pinene (340.6 g kg⁻¹), α -cetene (230 g kg⁻¹) and 1,8-cineol (170.2 g kg⁻¹) are the major compounds, while husk EO consisted of 33 compounds showing 1,8-cineol (204.5 g kg⁻¹), limonol (188.9 g kg⁻¹) and β -pinene (143.4 g kg⁻¹) as major compounds.

These results show that seed EO is dominated by monoterpene hydrocarbons, while husk EO is dominated by their oxygenated derivatives. Table 1 compares the major aromatic compounds of various ATOC plants with studied *Aframomum* species. Other reports^{34,35} have shown that many *Aframomum* leaves yield EO rich in β -pinene, this monoterpene often being accompanied by its oxygenated derivatives. Therefore, this feature seems to be a characteristic of the genus *Aframomum*.

Fatty acid composition

The FA distribution from different parts of *A. giganteum* and *A. stipulatum* fruits is shown in Table 1. Figs 1A–F illustrate the distribution of which oleic acid constituted the major FA in different parts of *A. giganteum* and *A. stipulatum* fruits. Thus its content ranged between 594.6–668.8 g kg⁻¹ in seed and 362.3–273.0 g kg⁻¹ in husks. These results indicate that the accumulation of this FA took place in the seed, which is the main organ of its biosynthesis.

Other FAs (palmitic, stearic, and linoleic acids) in seed of *Aframomum* presented a similar content, ranging between 172.3–227.4 g kg⁻¹, 42.2–73.4 g kg⁻¹ and 31.3–43.9 g kg⁻¹, respectively. In husks, palmitic acid (227.4–272.7 g kg⁻¹) and linoleic acid (242.2–326.9 g kg⁻¹) were the main compounds.

From the results of the present investigation, it appears that the studied fruits are a valuable source of essential unsaturated FAs (Fig. 3). Today polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are well known for their value in nutrition and pharmaceutical industrial uses. Thus producers of nutraceuticals and dietary products are interested in natural sources of beneficial polyunsaturated PUFAs.^{44–46}

On other hand, oleic acid can be used as a raw material for fine chemicals. This FA is a useful compound in the production of many food products or for the manufacture of fatty esters, which

Table 2. Essential oil composition (g kg⁻¹) of different parts of *A. murrillianum* and *A. giganteum* fruits

Compound	A. murrillianum		A. giganteum	
	Seed (%)	Flask (%)	Seed (%)	Flask (%)
α-Hexan-2-ol	904	—	—	—
α-Thujene	929	1027	—	1.6 ± 0.1
β-Pinene	933	1028	56.2 ± 1.8	26.1 ± 1.1
Comphene	94.7	1029	—	—
Sabinene	975	1124	7.1 ± 0.2	19.2 ± 0.1
β-Pinenol	982	1118	610.2 ± 1.8	235.2 ± 1.7
Myrcene	991	1101	2.1 ± 0.1	3.4 ± 0.1
α-Phellandrene	1003	1126	—	—
β-Cymene	1027	1027	12.2 ± 0.2	49.2 ± 0.1
γ-Phellandrene	1031	1218	—	7.2 ± 0.2
Limonene	1032	1205	15.4 ± 0.3	33.3 ± 0.6
1,8-Cineol (eucalyptol)	1035	1211	35.1 ± 0.1	141.6 ± 0.2
Methyl acetate	1044	—	—	—
Isoborneol	1048	1093	1.7 ± 0.1	—
γ-Terpinene	1060	1266	—	12.6 ± 0.1
α-Ethylbenzene	1069	1458	—	—
Terpinolene	1080	1290	—	5.8 ± 0.1
Bornane-2	1091	1333	—	—
Undecol	1101	1548	2.2 ± 0.1	13.1 ± 0.2
α-Pinolol	1117	—	—	3.4 ± 0.1
Menth-2-en-1-ol (cis-pinch)	1121	1618	—	4.2 ± 0.1
Sabinol (m-phenoxyacetone)	1145	1606	4.9 ± 0.1	11.8 ± 0.8
Caryophyllene	1144	1932	—	—
Borneol	1156	1719	—	4.0 ± 0.1
Phenylpropanoic acid	1164	1688	9.5 ± 0.1	—
Terpinol-4-ol	1182	1611	—	111.6 ± 2.1
Cryptone	1190	1690	—	—
β-Terpinol	1196	1705	—	122.1 ± 1.84
Myrcenol	1199	1698	16.6 ± 0.4	—
Myrcenol I	1196	1641	—	—
α-Bornyl acetate	1206	—	—	5.1 ± 0.3
Bornyl acetate	1209	1933	—	—
Myrcenyl acetate	1212	1698	—	6.6 ± 0.2
α-Bornyl acetate	1209	1709	—	9.7 ± 0.1
β-Citronellene	1212	1600	5.9 ± 0.1	—
Pinenol	1240	—	26.0 ± 1.7	1.7 ± 0.1
β-Caryophyllene	1426	1421	91.7 ± 1.4	4.8 ± 0.1
α-Guaiene	1429	—	1.6 ± 0.1	7.0 ± 0.2
Alloaromadendrene	1450	1661	—	11.3 ± 0.2
Aromadendrene	1451	1628	1.7 ± 0.1	—
α-Humulene	1462	1687	77.6 ± 1.4	—
β-Humulene	1469	1715	14.3 ± 0.1	—
α-Defensene	1491	1744	2.8 ± 0.2	230.0 ± 5.1
Valencene	1493	1248	2.1 ± 0.1	19.4 ± 1.9
(2)- <i>γ</i> -Bisabolene	1502	1246	4.0 ± 0.1	—
γ-Bisabolene	1510	1241	1.1 ± 0.1	—
β-Cadinene	1522	1796	1.9 ± 0.1	—
7-Spiro- <i>n</i> -tetraene	1525	1740	7.2 ± 0.1	9.4 ± 0.1
Borneol	1550	2082	—	—
(E)-Menthadiol	1564	2050	—	—
(+)-Spathulenol	1583	2110	3.8 ± 0.1	—
Caryophyllene oxide	1588	1974	41.7 ± 1.0	23.2 ± 0.1
Cauful	1600	2103	2.0 ± 0.1	—
1,2-Epoxy humulene	1618	2210	26.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1

Table 2. (Continued)

Compound	R ^a	R ^b	Abundance relative		Abundance relative	
			Seed (H)	Husk (H)	Seed (H)	Husk (H)
Alkanes						
Alkanes	1638	-	4.2 ± 0.1	-	-	-
Caryophyllene-14(12,16)-diene-5- <beta-ol< td=""><td>1641</td><td>2299</td><td>-</td><td>6.0 ± 0.1</td><td>-</td><td>-</td></beta-ol<>	1641	2299	-	6.0 ± 0.1	-	-
γ -Cadinol	1651	2217	-	-	3.1 ± 0.1	-
Isomeric ketones	1660	-	13.0 ± 1.1	4.1 ± 0.1	3.0 ± 0.1	-
α -Cadinol	1664	2255	-	12.4 ± 1.3	-	-
Isopreneol	1667	-	-	5.1 ± 0.2	4.8 ± 0.1	6.4 ± 0.1
(2)- α -Santalol	1675	-	1.7 ± 0.1	-	-	-
Eustigmene-11(15)-ene-9-one	1682	-	-	8.5 ± 0.13	-	-
α -Bisabolol	1683	2233	-	-	-	6.9 ± 0.2
α -Dihydrocadinol	1714	-	1.3 ± 0.1	-	-	-
Aralia	1807	-	8.7 ± 0.1	-	-	-
Isocitronellal	2300	2300	-	10.0 ± 0.3	-	-
R	2357	-	44.4 ± 0.3	-	-	-
Kauran-16-18-dic acid, 6-hydroxy, 7-oxo	2469	-	6.6 ± 0.1	-	-	-
Pentacosane	2500	2500	-	4.4 ± 0.1	-	-
Total identified compounds (g kg ⁻¹)			977.7 ± 7.4	960.8 ± 4.2	1000 ± 3.1	989.9 ± 4.1
Chemical family						
Hydrocarbon terpenes			514.8 ± 6.5	392.8 ± 3.3	482.2 ± 8.1	387.8 ± 3.6
Oxygenated monoterpenes			66.4 ± 2.6	46.5 ± 5.3	225.5 ± 2.2	560.2 ± 6.5
Hydrocarbon sesquiterpenes			231.8 ± 4.3	8.6 ± 1.1	281.0 ± 3.5	17.2 ± 2.2
Oxygenated sesquiterpenes			106.8 ± 1.8	66.7 ± 1.3	13.2 ± 5.3	34.2 ± 1.1
Oxigenated sesquiterpenes			8.7 ± 1.0	14.4 ± 1.0	-	-
Chemical classes						
Alcohols			33.7 ± 1.5	34.0 ± 0.1	60.1 ± 2.5	238.8 ± 7.3
Diterpenes			-	-	3.76 ± 0.2	32.1 ± 1.3
Aldehydes			-	-	-	97.6 ± 4.8
Esters			-	15.6 ± 1.1	-	15.2 ± 2.1
Epoxytes			110.1 ± 5.0	181.2 ± 6.2	172.8 ± 5.5	215.6 ± 6.1

R^a, R^b, retention indices calculated using respectively an apolar column (H) and polar column (H) (in parentheses); volatile compound proportions were calculated from the chromatograms obtained on the HP Innotwist column. (*) Number of identified compounds; (N) not identified. Data are means ± SD of three replicates.

are used as biofunctional ingredients (emulsifiers and adjuvants) in formulation of bio-products.

Compared with other current ATOC resources (Table 1), the VOCs of *A. giganteum* and *A. stipulatum* exhibit a similar FA profile (oleic and linoleic acids).

Total sterol composition

Sterols are of great interest due to their antioxidant activity and positive impact on health.⁴² Moreover, analysis of sterols provides a powerful tool for the quality control of vegetable oils and for the detection of adulterated oils and mixtures not recognized by the FA profile.²⁹

Sterol contents of *A. giganteum* and *A. stipulatum* fruit parts are presented in Table 4. Good levels of sterols were estimated in oils, making up 4.3 g kg⁻¹ in seed oil and 8.5 g kg⁻¹ in husk oil (e.g. *A. giganteum*). Sterol contents of *A. stipulatum* husk oil were higher than those in extra virgin olive oil (1.5 g kg⁻¹),⁴³ sunflower oil (4.3 g kg⁻¹) and soy oil (3.5 g kg⁻¹)^{44,45} and similar to those in crude corn oil (3.5 g kg⁻¹) and rapeseed oil (8.2 g kg⁻¹). β -Strostanol (1.1–2.2 g kg⁻¹) was among the sterol markers in all fruit parts. High β -stostanol content was also found in the majority of vegetable oils,^{42,46} such as olive oil (0.7–2.6 g kg⁻¹), grape seed oil (1.6–2.0 g kg⁻¹), groundnut oil (2.6–2.8 g kg⁻¹), sunflower oil

(1.3–3.2 g kg⁻¹) and date seed oil (2.4–3.0 g kg⁻¹). This compound has been most intensively investigated with respect to its beneficial and physiological effects on health.⁴⁷

Other major sterols in seed of *A. giganteum* and *A. stipulatum* fruit parts (campesterol, stigmasterol and Δ^5 -avenasterol) ranged from 0.20 to 2.04, 0.37 to 1.33 and 0.13 to 0.26 g kg⁻¹ of sterols, respectively (Table 4). In husks, campesterol and stigmasterol ranged from 1.20 to 2.04 g kg⁻¹ and 0.37 to 1.33 g kg⁻¹, respectively. Stigmassterol is an unsaturated plant sterol which is used as a starting material in the manufacture of synthetic progesterone. On the other hand, no cholesterol was found, which is specific to animal lipids; it is generally found at low levels (1–5%) in most vegetable oils. However, it is possible to detect high cholesterol amounts in some vegetable oils, such as that of tomato seeds, in which cholesterol reaches about 20% of total sterols.⁴⁷

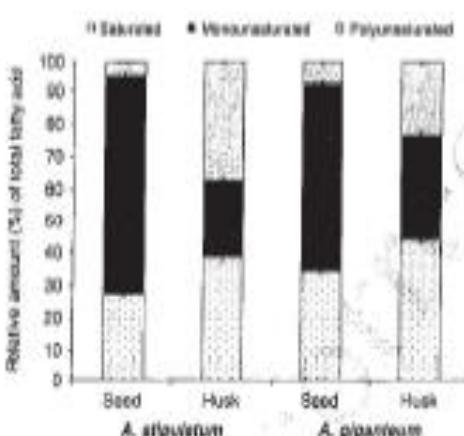
In addition, the β -stostanol/campesterol ratio can be used as an index to identify the purity and authenticity of oils. In the present investigation, the β -stostanol/campesterol ratio was 5.09 and 3.20 in seed oil of *A. stipulatum* and *A. giganteum* fruits, respectively. In husk oil the ratio values were 2.08 and 4.41, respectively. By comparison with other ATOC resources cited in Table 1, some researchers found β -stostanol/campesterol ratios of 5.20 for coriander fruit⁴⁸ and black cumin seeds.⁴⁹



101

Table 3. Fatty acid composition (g kg^{-1} TFA) of vegetable oils of different parts of *Aframomum giganteum* and *A. stipulatum*

Fatty acid	Aframomum giganteum		Aframomum stipulatum	
	Seed	Husk	Seed	Husk
C14:0 (myristic acid)	10.8 ± 0.4	15.0 ± 0.1	12.9 ± 0.9	14.9 ± 1.1
C16:0 (palmitic acid)	172.1 ± 5.6	202.7 ± 21.7	227.4 ± 18.6	202.9 ± 6.4
C18:1n-7 (oleic acid)	7.1 ± 1.9	34.2 ± 25.2	17.1 ± 4.9	50.3 ± 24.3
C18:1n-9 (linoleic acid)	73.4 ± 13.4	47.0 ± 1.8	44.1 ± 3.1	40.1 ± 3.1
C18:3n-9 (linolenic acid)	668.0 ± 14	462.3 ± 55.3	594.6 ± 56.4	273.0 ± 2.1
C18:2n-6 (linoleic acid)	31.2 ± 1.8	126.9 ± 33.9	43.9 ± 18.9	242.2 ± 14.2
C18:3n-6 (linolenic acid)	11.8 ± 2.3	61.8 ± 48.3	11.8 ± 1.3	54.2 ± 0.3
C20:0 (stearic acid)	4.9 ± 0.2	41.8 ± 7.8	4.4 ± 1.4	4.0 ± 0.2
C20:1 (arachidic acid)	11.8 ± 6.8	8.0 ± 0.1	12.2 ± 5.2	2.0 ± 0.2
C22:0 (behenic acid)	1.9 ± 0.1	12.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	5.6 ± 0.5
C22:1 (erucic acid)	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
C24:0 (dihydrostearic acid)	2.9 ± 0.2	16.5 ± 1.6	1.0 ± 0.1	12.0 ± 1.2
C24:1 (erucenoic acid)	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
Saturated fatty acids	288.2 ± 9.2	391.5 ± 1.6	326.8 ± 23.8	417.2 ± 26.2
Unsaturated fatty acids	733.8 ± 6.7	569.1 ± 21.1	676.2 ± 20.3	566.9 ± 18.2
MUFA	693.4 ± 7.8	290.5 ± 36.3	618.9 ± 41.1	399.2 ± 14.2
PUMA	43.0 ± 1.1	388.6 ± 15.4	57.3 ± 10.3	231.7 ± 24.4
PUMA/MUFA ratio	0.09 ± 0.003	20.20 ± 4.90	0.09 ± 0.01	0.84 ± 0.11
FAT (% Total oil)	3580	1250	2520	1170

Data are means \pm SD of three replicates.**Figure 3.** Total fatty acid relative amounts (%) of different parts of *Aframomum stipulatum* and *A. giganteum* fruits. Data are means \pm SD of three replicates.

Total tocopherol and tocotrienol composition

Only preliminary studies have been made on total tocopherol contents and their composition has been determined only for seed oils of *Aframomum* fruits (Table 5). The seed oil of *A. stipulatum* exhibits a low tocopherol content of 13.30 mg kg^{-1} as compared to that found in *A. giganteum* seed oil ($521.20 \text{ mg kg}^{-1}$). γ -Tocopherol (0.20 mg kg^{-1}) is the major compound of total tocopherols found in *A. stipulatum* seed oil, while tocotrienol occupies the majority ($440.20 \text{ mg kg}^{-1}$) of total tocopherols of *A. giganteum* seed oil. The presence of this family of secondary metabolites differentiates the two species of *Aframomum*. No β -tocopherol was found in either seed oil.

Tocopherols and tocotrienols are natural antioxidant compounds that give stability to oils.⁹ The presence of elevated levels of γ -tocopherol is very interesting and suggests antioxidant properties for these fruits.

CONCLUSION

In this study, wild Congo fruits were investigated for the first time for their seed and husk essential oil, fatty acid, sterol and tocopherol composition. According to the described results, different parts of *A. giganteum* and *A. stipulatum* fruits yield both EOs and VOs, indicating that these organs are excellent sites for the bioaccumulation of functional secondary metabolites. Therefore, these wild fruits can be proposed for several uses: the high content of β -pinene, 1,8-cineol, linalool and α -sabinene in their EOs, unsaturated PAs (oleic and linoleic acids), β -sitosterol, and tocotrienols suggest the exploitation of these fruits as a low-cost renewable source of bioactive and lipid compounds. This study corroborates the possibility of incorporating *A. giganteum* and *A. stipulatum* oils into food, cosmetic and pharmaceutical products.

On the other hand, the domestication of these wild species could greatly help to improve the amount and quality of both EO and VO oil fractions, and consequently the improvement of functional constituents of oils identified in this study. Furthermore, *A. giganteum* and *A. stipulatum* fruits have a dual bioavailability year (fruits harvested in October and April), thereby offering an added benefit in profitable oil production.

In terms of EO and VO yields and FA profile, we can consider that *A. giganteum* and *A. stipulatum* are a new potential class of ATOC resources compared with the few known ATOC species. This study may be important as an indication of the potentially economic utility of these tropical wild fruits as a new source of edible oils.

Table 4. Composition (mg kg^{-1}) of sterols obtained from oils of different parts of *Aframomum stipulatum* and *Aframomum giganteum* fruits

Sterols	<i>Aframomum stipulatum</i>		<i>Aframomum giganteum</i>	
	Seed	husk	Seed	husk
Coprostanol	0.26 ± 0.11	3.04 ± 0.64	0.74 ± 0.04	1.20 ± 0.19
Coprostanol	-	0.19 ± 0.04	-	0.03 ± 0.06
Sitostanol	0.75 ± 0.14	0.75 ± 0.10	0.37 ± 0.02	1.33 ± 0.19
β -Sitosterol	1.18 ± 0.03	4.31 ± n. on.	3.14 ± 0.21	6.40 ± 0.44
Stigmasterol	-	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01
α -Avenasterol	0.25 ± 0.06	0.13 ± 0.02	0.26 ± 0.06	0.15 ± 0.04
Graniosterol	-	-	-	0.01 ± 0.20
Cisstigmasterol	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.11 ± 0.03
Cyathostanol	-	0.10 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.22 ± 0.02
Methylated cycloartenol	0.08 ± 0.00	0.22 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01
β -Sitosteryl/carystanol ester	5.40 ± 0.17	2.06 ± 0.02	3.28 ± 0.21	4.87 ± 0.21
Total sterols (kg^{-1} oil)	2.41 ± 4.0	7.76 ± 2.36	4.30 ± 1.54	8.30 ± 3.59

Data are means ± SD of three replicates.

Table 5. Tocopherol and tocotrienol composition (mg kg^{-1}) of *Aframomum stipulatum* and *Aframomum giganteum* seed oils

Tocopherol and tocotriene	<i>Aframomum stipulatum</i>	<i>Aframomum giganteum</i>
α -Tocopherol	1.80 ± 0.75	3.00 ± 0.50
γ -Tocopherol	9.20 ± 3.10	75.85 ± 1.65
δ -Tocopherol	2.30 ± 0.40	4.35 ± 1.35
γ -Tocotrienol	-	490.20 ± 3.02
Total tocopherols (mg kg^{-1} oil)	13.32 ± 8.47	825.20 ± 1.60
Total tocotrienols (mg kg^{-1} oil)	-	410.20 ± 3.02

Data are means ± SD of three replicates.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Franco/Congo Cooperation Commission, Francophone University Agency (UFR), Dr Pierre Huot from ESPA Company (INPT contract 2008-0071), and EGIDE French Agency for financial support.

REFERENCES

- Abdalla DJ, *The Plant Book: A Portable Dictionary of the Higher Plants*. Cambridge University Press, Cambridge, UK (1987).
- Bouquet A, *Florae Africanae Indumenta Africanae in Congo*. Mémor. ORSTOM Paris, Brazzaville, Congo (1965).
- Opertmann G, Ang AHI and Ahi-AHI, *Alimentaire Traditionnelle et Pharmacopée: Contribution aux Oeuvres Ethnobotaniques et Pharmacologiques du Gabon*. ACCT, Paris (1981).
- Raponda-Walker A and Siem R, *Les Plantes Utiles du Gabon* (2nd edn). Fondation Raponda-Walker, Libreville, Gabon (1995).
- Adjouhour E, AFRAAMR, Adjouhour LA, Bemakine L, Chison P, Couzi G, et al, *Identification par la chromatographie en phase gazeuse des huiles essentielles et leurs propriétés sur les cellules cancéreuses de la peau humaine*. Rapport à l'Académie Nationale de la Recherche et des Techniques du Gabon. ACCT, Paris (1988).
- Perez V, Lindsay DG, Miettinen TA, Tolosa J and Lempp AM, Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J So Food Agric* 88:636–668 (2000).
- Avard AB and Irak CS, Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J Am Soc* 130:2127–2130 (2000).
- Bosch PJD, The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Can Open Clin Nutr Metab Care* 6:471–475 (2001).
- Crane S, Autier P, Joseph H, Moukoungui Z and Bourges P, Composition of fatty acids, tricylglycerides and unsaponifiable matter in *Cyperus spicatus* L. oil from Guadeloupe. *Phytochemistry* 68:1823–1831 (2005).
- Ngoula M, Roche J, Bouali A, Cerny M, Moukoungui Z and Merah D, Effect of genotype and sowing date on phytostanol–phytosterol content and agronomic traits in wheat under organic agriculture. *Food Chem* 117:219–225 (2009).
- Rapida J, Ngoula M, Bouali A, Cerny M, Moukoungui Z and Merah D, Sterol content in sunflower seeds (Unshelled variety L) as affected by genotypes and environmental conditions. *Food Chem* 114:990–994 (2009).
- Roche J, Ngoula M, Bouali A, Cerny M, Moukoungui Z and Merah D, Sterol concentrations and distribution in sunflower seeds (Unshelled variety L) during seed development. *Food Chem* 119:1451–1456 (2010).
- De Bernardi M, Mellado G, Pabonosse-Colombi M, Vidal G and Vitz-Prat P, Constituents of essential oil of *Aframomum giganteum*. *Planta Med* 45:330–333 (1979).
- Menut C, Lamaty G, Anwan Zolle MH, Angolo BM, Alberdi R and Besseille JM, Aromatic plants of tropical central Africa. V. Volatile components of three *Zizaniopsis* from Cameroon: *Zizaniopsis miliacea* (Paspal.) Schult., *Z. glauca* (Paspal.) Schult. and *Z. latifolia* (Kunze) Harms. *Flavour Fragr J* 6:181–188 (1991).
- Hari L, Bokunu J and De Poorter H, The volatile fraction of *Aframomum giganteum* (K. Schum.) from Burundi. *J Environ Sci Res* 6:395–398 (1994).
- Adigpolo CO, Jagmohan Patel, and Sankaracharyulu, A comparison of the essential oils of *Aframomum dasycarpum* (Benth.) T. S. Sankar and *Aframomum subulatum* (Benth.) Floder. *Fragr J* 13:349–352 (1998).
- Bauer KDC and Kuriyanukul M, The essential oils of *Aframomum comatum* (Benth.) Jameson and *Aframomum giganteum* K. Schum from Africa. *Essential Oils* 12:208–209 (2001).
- Agneret H, Menut C and Besseille JM, Aromatic plants of tropical central Africa Part XIIB: Chemical composition of essential oils of the leaf and rhizome of *Aframomum giganteum* K. Schum from Gabon. *Phytochemistry* 71:880–889 (2004).
- Couppé MA de K Martin, Jaisson H, Bercion S and Menut C, Chemical composition of essential oils from aerial parts of *Aframomum giganteum* (Burm) Nees collected in Guadeloupe, French West Indies. *Flavour Fragr J* 21:902–905 (2006).
- Möller KD, Hähnen U, Mälik HP and Schöniger G, Transesterification of fatty acids from microalgae and human blood serum by trimethylsilylboron hydride (TMSBH) for GC analysis. *J Chromatogr* 30:243–248 (1996).
- Dierlebach A and Poldinger WD, *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives* (1st suppl. to 7th edn).

- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Oxford (1997).
22. Albers RF. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry. Allured, Carol Stream, IL, USA (2001).
 23. Nkoukou Loumpangou E, Goudjily L, Mammou Y, Eboko Ndinga AM, Ouamba BA, Chalhoub JC, et al. Comparative study of the chemical composition of the essential oils from organs of *Aleurites megalosperma* Pers. (*Aleurites le Thomas*) subspecies (*Aleurites*, *A.* (*Aleurites*) 9:887–891 (2010).
 24. Wale A, Nwankwo A, Iheanacho J. Fatty acid and essential oil compositions of the seed oil of five *Aleurites* species. *Pigment Cell Res.* 8:62–65 (2000).
 25. Bochar Lamberti A, Alouga A and Marzocchi R. Fatty acid and essential oil composition of three *Turritis* (artemisia) *Krasnitzk* and Li seed ecotypes. *J Sci Food Agric.* 90:191–196 (2010).
 26. Siedler-Luszkońska K, Baranowska M, Baranowski R and Krol D. Bxam analysis of turmeric (Curcuma longa L.) single nuclei: estimation of essential oil content and its composition. *J Agric Food Chem.* 58:5271–5275 (2010).
 27. Feng R, Jiang QL, Wang XY, Zhang HM, Liu ZL, Zhou L, et al. Insecticidal activity of essential oil of *Careya arborea* fruits from China and its main components against two grain storage insects. *Molecules* 16:9391–9402 (2010).
 28. Amri A, Rabhi L, Benmali MN, Bouy A and Ait-Boudaoud B. Isotacticity, fatty acid and sterol composition of Tunisian medlar fruit different parts. *J Sci Food Agric.* 88:1839–1844 (2008).
 29. Barudan M and Mivel JF. Oil composition of cardamom (Elettaria cardamomum L.) fruit seeds. *Eur Food Res Technol.* 215:204–209 (2002).
 30. Khoshki L, Mirzaei SF and Tahvabehi MF. Oil content and yield of *Forsythia koreana* Mill. ex Stevnskova seeds affected by different plant cultivation densities. *J Am Sci.* 6:1098–1108 (2010).
 31. Barros Lillian CAM and Fernandes Ivelize CPH. The nutritional composition of fennel (Foeniculum vulgare) shoots, leaves, stems and inflorescences. *Lisbona WHO Proveo.* 43:814–816 (2010).
 32. He W and Huang B. A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice *Zanthoxylum bungeanum*. *J Med Plant Res.* 5:3593–3600 (2011).
 33. Bourges Bourguet B, Gaidet M and Marullo B. Fatty acids, essential oil, and phenolic modifications of black currin fruit under NaCl stress conditions. *J Agric Food Chem.* 58:1299–12406 (2010).
 34. Wols A, Bartkowiak R and Kalentwa D. Composition of essential oil from seeds of *Alpinia galanga* L. cultivated in Poland. *Herczeg Fizika* 23:126–132 (2008).
 35. Chedid-Kadouane S, Berdane S, Henriet R, Blachier F, Desvergne C, and Alibert R. Myrtle (Myrtus L.) chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Pest Chem.* 10:1973–1981 (2007).
 36. Tuglu A. A comparative study on fatty acid composition of black currin obtained from different regions of Turkey, Iran and Syria. *Agri Aras.* 6:892–895 (2011).
 37. Onançoglu R. Evaluation of content and composition of fatty acids, total phenolic and antioxidant of *Botryococcus braunii* (Bacillales, Chlorophyta). *J Med Aromatic Plants* 28:111–119 (2009).
 38. Saeedi RA and Omidfar S. Chemical characteristics of the seed of Iranian endemic plant *Aleurites eriantha*. *Chem Ind Control.* 46:815–819 (2010).
 39. Chipaux EH, Hall DR and Forman DI. Volatile constituents of leaf and stem extracts of African savanna plants used in traditional African medicine. *Planta Med.* 54:487–499 (1988).
 40. Ngombe MB, Yousou S, Jemmi L, Bechir G and Fleury H. Medicinal plants from Cameroon: analysis of the essential oil of leaves and rhizomes of *Apiumanthus latifolius* K. Schum. (Umbelliferae). *J Ethnol Botany* 2:35–43 (1999).
 41. Adhami RG. DNA can it benefit salmon industry? *J Aquat Food Prod Technol.* 16:171–176 (2007).
 42. Anderson RG. Docosahexaenoic acid in the infant and its mother. *UpToDate* 34:125–128 (1999).
 43. Datto PC, Hemmerich S, Rebede E, Neimark G and Appelquist LA. Variation in lipid composition of Niger seed (Guizotia abyssinica L.) samples collected from different regions in Ethiopia. *J Am Oil Chem Soc.* 71:839–841 (1994).
 44. Solivella ME, Aranda P, Gomez-Ariza L and Freigas-Perez D. Chemical virgin olive oil: a study of five crop seasons: composition, quality and sensory stability. *New J Chem.* 24:267–274 (2000).
 45. Guedan M, Toffi S, Angerbach A and Knoor D. Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *J Food Eng.* 67:281–287 (2003).
 46. Holst A, Anchi O and Alasa H. Membrane-based desorption, degumming and deacidification of vegetable oils. *Enzyme Food Sci Engng Tech.* 6:203–212 (2005).
 47. Peltzer M, Favre JC and Herault-Rivet J. Rapidez: analyse des aliments. Tome 1. Table de composition des aliments. INRA – Tec & Doc, Paris (1987).
 48. Berthia S, Becker C, Darosse C, BelHadj K, Lognon G, Hervé-Bodard B, et al. Rice starch rheology, texture and sensory profiles. *J Food Lipids* 11:251–265 (2004).
 49. Yang T, Karlaftis MM, Christou PH and Iatrou HF. Phytochemicals in sea buckthorn (Phylica praecox) L. berries: identification and effects of different origins and harvesting times. *J Agric Food Chem.* 49:3620–3629 (2001).
 50. Hamzavi-Sellami I, Kchouk ME and Maroufi B. Lipid and aroma composition of black currin (*Alpinia galanga* L.) seeds from Tunisia. *J Food Biochem.* 32:315–323 (2008).
 51. Mergi C and Oles S. Chemical composition of *Alpinia galanga* L. seeds. *Food Chem.* 48:259–261 (1993).



**Melting temperature of saturated-monounsaturated fatty acids,
monoglycerides of *Nephelium lappaceum***

Journal:	<i>European Journal of Lipid Science and Technology</i>
Manuscript ID:	eJLT.201200188
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	20-May-2012
Complete list of Authors:	Ngalegni-Umbili, Adolphe Christian Valentin, Romain; ENSIACET, INPT, INRA, 4 allée Emile Monso, BP 44362, 31030 Toulouse cedex 4, France, CERA Ouamba, Jean-Maurice Mouloungui, Zéphirin
Keywords:	<i>Nephelium Lappaceum L.</i> , Melting temperatures , Monoglycerides, lipase hydrolysis, chemo-catalytic esterification
Additional Keywords (select from list):	Oil sources, Fatty acids, Polymorphism, Light microscopy

SCHOLARONE®
Manuscripts

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

Melting temperature of saturated-monounsaturated fatty acids, monoglycerides of *Nephelium lappaceum*

Adolphe Christian NGAKEGNI-LIMBILI^{a,b}, Romain VALENTIN^a Zéphirin MOULOUNGU^{a*}, Jean-Maurille OUAMBA^b

^a Université de Toulouse - UMR 1010 Chimie Agro-Industrielle, ENSIACET, INPT, INRA, 4 allée Emile Monso, BP 44362, 31030 Toulouse cedex 4, France

^b Unité de Chimie du Végétal et de la Vie, Faculté des Sciences – Université Marien Ngouabi, BP 69, Brazzaville, Congo

*Corresponding author

Tel.: +33 (0)5 34 32 35 20; Fax: +33 (0)5 34 32 35 38

E-mail address: Zephirin.Mouloungui@ensiacet.fr

Keywords: *Nephelium Lappaceum* L. / Melting temperatures / Monoglycerides / lipase hydrolysis / chimio-catalytic esterification

1
2

3 **Summary:** We studied the transformations of reserve lipids (RLs) of the species *Nephelium*
4 *Lappaceum* Linn (*N. Lappaceum*) of which the triacylglycerol (TAGs) are composed of C18:1,
5 C20:0 and C20:1 fatty acids (FAs). This is focused on the explorative study of the transition
6 from native triglycerides to homogeneous partial glycerides as pure monoglycerides (MGs).
7 The effect of the fatty acid composition with the presence of binary systems of saturated-
8 unsaturated fatty acids on physical properties and physico-chemical properties of molecules of
9 fatty acids and monoglycerides was studied. The first step was the lipase-catalyzed hydrolysis
10 of native triglycerides. The second step was the chymo-catalyzed esterification of native fatty
11 acids into monoglycerides. The first and second steps have been carried out in organized
12 media used as microreactors. The presence of long-chain monoglycerides (C20: 0 and C20: 1)
13 affected the physical properties in such mixture including the melting temperatures that will
14 be quite high (about 60°C or more). Moreover, monitoring the saturated-unsaturated
15 constituents ratio for the lipo transformation into long chain RLs, AGs and MGs, it is
16 possible to control the composition of binary or ternary mixtures and their structures, and
17 therefore control the physicochemical properties of the systems, very useful directly for
18 intended application in food, cosmetic and pharmaceutical industries.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **Practical applications:** In this work, we carried out lipochemical transformation starting
34 from *Nephelium Lappaceum* L. oil kernels to prepare high melting temperature FAs and MGs.
35 We demonstrated these pathways could be of interest in food because we improve the content
36 of C20:0 and C20:1 acids from the TAGs of the *Nephelium Lappaceum* L. species. Their
37 surfactant and physical properties are of interest for applications in food, cosmetic and
38 pharmaceutical industries.
39
40
41
42
43
44
45

46 1 Introduction

47

48 Fats and lipids are used in food, cosmetics, pharmaceuticals, etc. ... as the main base for
49 finished products, or as matrices in which the cosmetic, pharmaceutical and chemicals are
50 dispersed [1]. Fatty acids and glycerides molecular species are constituents of fats and lipids
51 that are classified as long-chain compounds [2]. Crystallization of fats and lipids leads to
52 important industrial implications: the treatment of end products formed crystals of fat, such as
53 chocolate, margarine, whipping cream, etc., and separation of fat from specific natural
54

55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

resources. Fats and lipids are the natural resources of vegetable and animal fats that contain various molecular species with different chemical and physical properties. It is interesting to note that there is a growing need to develop technologies for obtaining high-fat and low melting temperature. The aim is thus to avoid the production of processed products from the hydrogenation, which can cope with new regulatory standards but also to maintain better functionality compared to conventional products [3]. If the use of oils from the animal kingdom as fish oil is recommended due to the high content of monounsaturated fatty acids essential, the production of vegetable oils rich in monounsaturated fatty acids potentially more physically stable chemically by the low polyunsaturated acids is an original and interesting.

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

There is no long-chain compound which is not polymorphic, and this property is more extensive in fats and lipids. For example, a triacylglycerol (TAG), a fatty acid ester of glycerol, generally has three polymorphs. The crystallization behavior of TAG as the crystallization rate, crystal size and their network, crystal morphology and crystallinity, are directly influenced by the polymorphism which depends on the molecular structure itself, and by several external factors such as temperature, pressure, solvent, the rate of crystallization, impurities, etc. The conversion of TAGs into partial glycerides as pure monoglycerides is an interesting challenge. MGs have many different self-assembling structures due to their amphiphilic character. Monoglycerides-H₂O systems give rise to a variety of mesomorphic states between lipid and crystal [4]. These structures include micellar, lamellar, cubic and hexagonal mesophases. The polymorphic properties of MGs depend on the fatty acid compositions in saturated or unsaturated acids, short chain acids, even or odd carbon number acids. For example, 1-monostearin (melting temperature 81°C) gels are stable at about 80°C and 1-monoolein (melting temperature 35°C) are stable at about 20°C [5].

41
42
43
44
45
46
47

The oleochemical industry presents many ways and many chemical reactions to transform oils or triglycerides into oleochemical derivatives. We were interested in these oleochemical transformations to value diversity of fatty acid composition of unconventional species addressed in this work.

48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The first step in the lipotransformation of reserve lipids of this species was the lipase hydrolysis of native triglycerides by the presence of *Candida rugosa* extract using by the patented process of Mouloungui and Mechling [6]. This is our preferred method which can be systematically processed with reserve lipids of whole oilseeds, industrial domestic or emerging with the major advantage of the three-phase partitioning of major lipid components in emulsion. Applied to crude vegetable oils, semi-crude or refined, the repeatability and

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

reproducibility have been shown. The second step is to study the chimio-catalytic esterification [7] of native fatty acids. The first and second steps are carried out in organized media. These organized forms are composed of native surfactant molecules (phospholipids and membrane proteins [8]) or generated *in situ* (mono-, diglycerides) as and when their concentration increased [7]. Organized forms appear spherical micelles, vesicles, cubic phases, lamellar phases, hexagonal phases of engineering ... In lipochemical reactivity, these objects are used as microreactors [9]. The advantage was to achieve the reversible oleochemical reactions under experimental conditions less energy because the reactants are localized and concentrated. The efficient transformation of native or free TAGs may be considered by coupling biocatalytic and chemo-catalytic pathways to prepare FAs and pure MGs. In this study, the structure and the polymorphic evolutions of FAs and MGs mixtures have been characterized by use of Differential Scanning Calorimetry (DSC) coupled with the observation of structures with an optical microscope. DSC described highlights of energetic phenomena occurring during the heating or cooling of the sample. The aim of this study is to evidence all possible polymorphisms of saturated C20:0 and monounsaturated C18:1 and C20:1 pure FAs and MGs and their binary-ternary systems.

2 Materials and methods

2.1 Plant material

Nephelium Lappaceum L. (*N. Lappaceum*) kernels are collected in September and December 2010 in the region of Boko (South Congo; latitude 4°47'12"S, longitude 14°37'44"E; altitude 595 m. In the laboratory, the samples are depulped. The kernels were milled with the MF 10-IKA grinder and the oil was extracted using the Accelerated Solvent Extractor (ASE 2000) equipped with 11 mL cells, analytical balance and Dionex vial for collection of extracts (40 mL; P/N 49465), using cyclohexane as solvent. Oil extract was concentrated in a rotary evaporator by distillation at reduce pressure and 40°C until the solvent was totally removed. Mean kernel content was determined gravimetrically using three different samples replicated three times [10, 11].

2.2 Reagents

Candida rugosa lipase (LIPOLYVE CC) was purchased from Lyven (Nantes, France). Glycerol (99.0% pure) was obtained from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Dodecylbenzene sulfonic acid (DBSA) was purchased from Acros Organics (Geel, Belgium) and extruded molecular sieve 3Å from Prolabo (Paris, France).

2.3 Analysis of fatty acids by chromatography

100 µl of sample were dissolved in 1 mL of cyclohexane and 180 µl were silylated with 20 µL of reagent (50 µL methyl imidazole in 1 mL of methyl-trimethylsilyl heptafluorobutyramide). The reaction mixture was then stirred. The chromatographic analysis conditions are as follows: column CP Sil 8CB low bleed MS Varian (15 mx 0.32 mm x 0.25 m), the carrier gas is helium (15 psi column head), the oven: 55°C for 0.5 min, then 45°C / min to 80°C, then 10°C/min to 360°C and 360°C for 26 min. The internal standard used was heptadecan.

2.4 Enzymatic hydrolysis

The hydrolysis takes place in a 500 mL glass jacked reactor vessel thermostated at 37 °C. Mechanical stirring was allowed by a homogenizer (model L4RT, Silverson Machines Ltd. Chesham, England). 25 g of oil (triglycerides) were weighed directly into the reactor and added to 100 mL distilled water. The reactor temperature is maintained at 37 °C (set temperature of lipase), the mixture of water - lipids stirred at 750 rpm. The lipase amount of *Candida Rugosa* was adjusted to 1% of the mass of triglycerides and dissolved in 25 mL of water. After stirring for 15 min, the enzyme solution was added in the reactor under stirring. A first sample was taken at that time, (t0) and the kinetic is monitored for 6 hours. After 6 h of hydrolysis, the reaction mixture was cooled to 4°C for 2 hours, then heated to 50°C and centrifuged at 6°C for 10 min at 10000g to separate the upper organic phase (fatty acids) of the aqueous phase (water, glycerol, lipase). The organic phase was recovered by filtration on a nylon sieve and centrifuged for maximum for complete removal of water.

2.5 Reaction of esterification

The reaction is conducted in a 250 mL reactor equipped with an Ultraturax T25 (IKA Labortechnik Staufen, Germany) and the reactor is connected by a peristaltic pump to a stainless steel jacketed reactor column (height = 240 mm, internal diameter = 25 mm).

The reagents were introduced into the reactor in the following proportions: 0.2 mol. of fatty acids, 0.4 mol glycerol and 0.025 mole of dodecylbenzenesulfonic acid (DBSA). The temperature was then maintained at 120 °C and the mixture was stirred using an Ultraturax (stirrer speed in position 5). A brown translucent microemulsion was obtained. The peristaltic pump is activated so that the residence time of reactants in the reactor column filled with

1
2
3 molecular sieve (120 °C) was 45 min and the total duration of the reaction 1 h (120°C). At
4 the end of the experiment, pure glycerol was introduced in the reactor column to the recover
5 the entire the reaction medium.
6
7

8 The reaction mixture was recovered and washed with a saturated NaCl solution (3 × 100 mL)
9 in a separating funnel to remove excess glycerol and the DBSA.
10
11

12 2.6 Light microscopy

13 The observations were made with an optical microscope Nikon Eclipse E600 (Nikon
14 Corporation, Japan) equipped with polarized filters and equipped with a hot stage Mettler
15 Toledo FP82 HT managed by a central unit FP90. The images were acquired by a color
16 camera, high resolution, low noise CCD Nikon DXM-1200 and analyzed using the software
17 LUCIA G version 4.8. The melting temperatures of the samples were determined using the
18 following heating program: heating to 30 °C to 80 °C to 5 °C / min. Snapshots are taken
19 every 24 seconds, an image level.
20
21

22 2.4 Calorimetric experiments

23 Calorimetric experiments were performed by a DSC Pyris 1 apparatus (Perkin Elmer, USA),
24 equipped with a cooling system IntraCooler. The purge gas was nitrogen at a rate of 20
25 mL/min. Indium ($T_m = 156.6^\circ\text{C}$) and distilled water ($T_m = 0^\circ\text{C}$) are used for calibration of
26 temperature. Data were analyzed using Pyris software (Perkin Elmer). Stainless steel capsules
27 equipped with O-rings are used. The programming of the temperature is the following: from
28 +25°C to -50°C, at 20°C/min. Isothermal to -50°C for 5 min. Heating from -50°C to 80°C to
29 20°C/min.
30
31

32 Determination of melting temperature: The melting temperatures of the compounds were
33 determined by DSC optical hot stage microscopy. In DSC, the melting temperature is the
34 temperature at which the melting endothermic peak was maximum. By microscopy, the
35 melting temperature was the temperature at which the product observed between the blade
36 holder and the slide observation has completely melted.
37
38

39 2.5 Flash chromatography purification

40 Method of separation and purification by flash chromatography: In order to obtain high purity
41 sample of monoglycerides and diglycerides, the reaction products synthesized by
42 esterification of fatty acids of *N. Lappaceum* and glycerol were purified by flash
43 chromatography (Combi flashretrieve, Serlabo, Entraigues sur la Sorgue, France). 2 grams of
44 the mixture were deposited on a carton of 12 g of silica solid phase extraction cartridge (mm
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

diameter, 200mm high, Grace Davison, Templemars, France). The elution was performed with diethyl ether at a rate of 6 ml / min. Fractions of 3 mL were collected in the system output in tubes and the solvent was evaporated. The fractions of the same type are collected and stored protected from light. The DBSA very polar, so was not eluted and remained in the lead column, it was driven in the final analysis by elution with ethanol. Product purity was determined by gas chromatography.

15
16
17
18

3 Results and discussion

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

3.1 Quantity of oil and composition of fatty acids of *N. Lappaceum*

The amount of oil extracted from all samples ranged from 35.5% ± 0.1% to 36.8% ± 0.08%. Curiously, the quantities of oil extracted from *N. Lappaceum* kernels were significantly very high. The content of total lipids is 35.5-36.8 %, proteins 2.8-6.6%, and fiber 2.6-2.9 %. These values of total lipids are comparable to those reported by Augustin [17](total lipid content 37.1-38.9%), Solis-Fuentes [18] and Winayawanwattikun [19]. All these works showed a composition of major fatty acids constituted by C18:1 (38.55%), C20:0 (22-36%) and C20:1 (0-7.2%). On the other hand, our work show for oil of *N. Lappaceum* of Boko Congo a composition of major fatty acids constituted by C18:1 (44.7%), C20:0 (28.6%) and C20:1 (8.1%). According to the investigations of Winayawanwattikun [19], the potential of Rambutan or *N. Lappaceum* is characterized by high yield of oil extraction (39-41 % w/w), high average productivity yield (2421 kg/ha versus 1690 kg/ha for peanut or 1260 kg/ha for soybean), average oil yield (200.0 kg/ha equivalent to soybean with 210.6 kg/ha). *N. Lappaceum* from Boko can to position as alternative source of these unusual fatty acids species from C20:0 and C20:1.

43
44
45

3.2 Lipase hydrolysis

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The results of enzymatic hydrolysis of the oil of *N. Lappaceum* in a stirred reactor with *Candida rugosa* lipase showed that the free fatty acid content achieved 78.9% after 6 h of hydrolysis. The curve of kinetics of formation of fatty acids showed that the hydrolysis was complete in 2 h (Figure 1). Concentration of reaction intermediates (diglycerides and monoglycerides) remains low. The content of diglycerides is between 16 and 12%. Low monoglycerides contents were also observed (4-7%). Similar observations were made by Ibrahim et al. [12], who studied the hydrolysis of olive and tallow oils with *Candida rugosa* lipase. These low amounts of molecules can play the function of surfactant and could act

1
2
3
4
5

further as compatibilizers of immiscible reactants in reactions such as esterification in the microreactors.

6
7
8
9
10
11
12

The relative composition of free fatty acids after hydrolysis is reported in Table 1.

13
14
15
16
17

The fatty acid profile obtained during the hydrolysis presents two main families of fatty acids: i) medium chain fatty acids (oleic and linoleic acid); ii) long chain fatty acids (arachidic and eicosenoic acid).

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Oleic acid, gadoleic and arachidic fatty acids were the major products of hydrolysis with respective contents and 40%, 27% and 16%. Monoglycerides and diglycerides content were respectively 7.7% and 12.6%.

The originality of our work lies in the fact that the fatty acid composition derived from the hydrolysis of the oil of *N. Lappaceum* one hand is rich in long chain saturated fatty acids (27% arachidic acid C₂₀H₄₀O₂, C20: 0), with improvement of the content of monounsaturated long chain fatty acids, eicosenoic or gadoleic acid C20: 1 with a content of 16%. By comparing our results with literature data, it appears that very few species, except jojoba produce oils with high levels of arachidonic acid (Table 2). In addition, in the case of jojoba, it is not triacylglycerols but the esters of fatty acids and fatty alcohols.

The high proportion of 11-eicosenoic acid, 16% in oil of *N. Lappaceum* occurs in the animal kingdom in fish: Herring C20: 1 17.9%, cod C20: 1 19.0%. This content contributes significantly to raising the ratio $r = \text{monounsaturated} / \text{saturated} = 1.76$ and better compared to peanut oil $r = 1.5$, cod liver oil $r = 1.5$, sardine oil $r = 1.45$ and olive oil $r = 1.8$ (source reference [13]). As recommended by FAO [14], the oil of *N. Lappaceum* presents an equilibrated fatty acid composition in favor of essential monounsaturated fats.

As result, residual mono and diglycerides remaining after the reaction of hydrolysis of reserve lipids seem to be very interesting because constituted of essential fatty acids. They are bioactive molecules for which it is necessary to encourage their production by chemical synthesis. This is even more interesting than the hydrolysis of the oil of *N. Lappaceum* leads to the production of an organic medium gadoleic acid richer in that the starting oil (Table 1 and Table 2). The hydrolysis was carried out by enzymatic catalysis. The difference in composition in eicosenoic acid (C20: 1) before and after hydrolysis was probably due to the typeselectivity of *Candida rugosa* lipase. This point reinforced the need for production of molecules rich in essential fatty acids by chemical synthesis.

3.3 Catalytic esterification reaction

1
2
3
4
5
6
7
8
9

We choose the synthetic route of esterification of fatty acids with glycerol, carried out without conventional solvent, in the presence of an acid catalyst, dodecylbenzene sulfonic acid. The reaction is reversible. It leads to the formation of water and glyceride products (Figure 2). The control of the molar ratio of reagents determined the yield and selectivity of the reaction.

10
11
12
13
14
15

Fatty acids and glycerol are immiscible reactants. The use of catalyst having properties of emulsifying agent, such as DBSA, which promotes both acid catalysis and the contacting of the reactants by its surfactant properties was an interesting way[7].

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

Figure 3 present the kinetic of course of the reaction of esterification. The maximum conversion of fatty acids (80%) is reached very quickly in 20 min, before passing into the column reactor containing the molecular sieve 3Å. The compositions in monoglycerides, diglycerides and triglycerides were then constant and maximum (Table 3). The reaction takes place mainly in the stirred reactor and led to a higher yield in monoglycerides than in the study of Eychenne and al.[7] with the synthesis of glycerol monooleate. This is probably due to the quality of microemulsions observed during the reaction. These microemulsions are constituted of saturated-monounsaturated long chain fatty acids and of mono-diglycerides. There are original micrereactors. Throughout the experiment, we observed that once the reaction temperature reached, the reaction mixture became homogeneous single-phase, while the constituents present, glycerol and fatty acids are immiscible. This is due to the combined action of the catalyst DBSA surfactant, surfactants generated *in situ*, and temperature. This microemulsified reaction system behaves as a single phase which allows optimal contacting between reactants. Diffusion phenomena become non-limiting. The mass transfer is promoted. The formed water during the esterification participates in this microemulsified system and appears to be "compartmentalized" and isolated from reagents. This then causes a shift in equilibrium favoring the production of monoglycerides.

45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The composition in monoglycerides is detailed in Table 4. We noted that the proportion of glycerol monooleate is 45% and the one in glycerol monoarachidate 26%, composition very close to the fatty acid content of the before hydrolyzed oil. The C20:1 monoglyceride content is slightly lower than C20:1 fatty acid in the oil. It goes from 16% to 12.2%. This difference could be caused by a slightly higher reactivity of eicosenoic acid, monounsaturated fatty acid that may be found in the form of di-and triglycerides in higher proportion. The quantification of the fatty acid content in triglycerides formed has not been performed. The content of C20:1

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

in monoglycerides, however high and worthwhile for the evaluation of physicochemical properties.

We confirmed the identification of the compounds by mass spectroscopy.

3.4 Physico-chemical study of C18:1, C20:0 and C20:1 *N. Lappaceum* monoglycerides

The compositions of two fractions of purified monoglycerides are reported in Table 5. This table gives the fatty acid composition of pure monoglycerides.

The melting temperature of a substance is one of its most important physical properties. It plays a major role in determining the relevance and applicability of a substance in food and nonfood applications endless. Many structural elements influence the melting temperature of an organic compound: molecular weight, the number and configuration of double branching, stereochemistry, and the presence of one or more polar groups such as hydroxyl functions.

Most compounds with long hydrocarbon chains have polymorphic crystalline forms which vary according to their chemical nature, their environment and solidification conditions. The concept of polymorphism suggests the possibility that a substance can crystallize in different crystalline forms that can be more or less stable.

We determined the melting temperatures of various substances by cross-polarized light microscopy using a hot stage. The melting temperature is taken when there is no observable solid. The melting temperatures according to different transformations and characteristics of the samples were determined and presented in Table 6.

The oil of *N. Lappaceum* has a melting temperature of 20°C. Its hydrolysis leads to the production of a mixture of fatty acids having a very high melting temperature of 63°C. The method of synthesis by esterification allows the production of mixtures of α-monoglycerides of high purity, glycerol monoarachidate, glycerol monogadoleate and glycerol monoleate. We have shown, by purification of the various fractions contained in the reaction mixture, that the composition of monoglycerides is a very important parameter that influences the melting temperatures. Two pure fractions to 100% monoglycerides, but containing different proportions of monoglycerides (Table 6, lines 7 and 8) have different melting temperatures. One containing the most of the glycerol monoarachidate presents the higher melting temperature (56°C). By calculating the melting temperature of a mixture of monoglycerides by weighting the melting temperatures compared to the theoretical composition of the mixture (in relation to the melting temperatures of the MG-C18: 1 and MG-C20: 0, the melting temperature MG-C20: 1 being unavailable in the literature) we found the experimental results.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

This was done for mixtures of pure monoglycerides. Thus the "reconstitution of a mixture of monoglycerides (1)" leads to a melting temperature of 51°C very close to 56 ° C obtained experimentally, and " reconstitution of a mixture of monoglycerides (2)" led to a melting temperature of 39 ° C also close to 51 ° C determined experimentally. The differences may be due to the fact that the physical properties of these molecules are not additive and also the fact that the MG-C20:1 is not taken into account and probably plays a significant influence. The phenomenon is totally different with regard to fatty acids. If we perform the same type of calculation, we find values of melting temperature very far from the experimental results: 28°C calculated against 63°C measured for the mixture of fatty acids 98% pure. In this case the organization of fatty acids is such that the fatty acid having the highest melting temperature of the highest, then it is not in the mixture majority (28.3 % arachidic acid, MT = 75 ° C), stabilizes physically fatty acids of lower melting temperature such as oleic acid (39.6% in the mixture, MT = 16°C) and eicosenoic acid (16.3% in the mixture, MT = 30°C). The melting temperatures increase in the order tri-, monoglycerides. This is only valid for the same hydrocarbon chain monoglycerides. Indeed, in our study, there are mixtures of tri-, di-, monoglycerides consist of saturated fatty acids (arachidic) and unsaturated (oleic acid and eicosenoic acid). This complicates the understanding of physical phenomena. Indeed Table 6 clearly shows the following increasing order of melting temperatures: triglycerides <monoglycerides <fatty acids. The difference in melting temperatures between the oil source (considered as a mixture of triglycerides) is very high (around 30 ° C) and superior to the trends described in the literature [24].

38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

3.5 Study of polymorphism

In our work, we were interested to the calorimetric study of reaction systems from the processing of the oil of *N. Lappaceum*. Figure 4 shows the thermogram of the oil constituted of triglycerides whose fatty acid composition is dominated by the ternary mixture of oleic acid / arachidic acid / 11-eicosenoic acid.

The samples are in the solid state at room temperature. They were cooled to -50°C to 20°C/min in order to compare their physical behavior by applying the same treatment.

Triglycerides present four endothermic peaks: -34°C, -13°C, 8°C and 19.4°C. The hydrolysis of these triglycerides leads to a mixture of fatty acids for which thermogram is given in Figure 5. Here the main peaks of phase change are different from those obtained for the mixture of triglycerides: -5.4°C, 4°C, 55°C, 59°C, 60°C, 62°C. Polymorphism seems to be here more complex than for triglycerides while the fatty acid composition is the same. The complexity of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

the polymorphic system is exacerbated by analyzing the mixture of the synthesized monoglycerides (Figure 6). The endothermic peaks of phase change are even more numerous. The mains are: -14. 9°C, 2.5°C, 29.3°C, 40.7°C, 49.5°C, 50.5°C, 51.7°C, 53.2°C, 54.1°C, 58.7°C. Analyses showed that the complexity of the polymorphism increases in the order: triglycerides - fatty acids - monoglycerides. The length and the nature of the lipophilic fatty chains can be considered constant because of the same origin. The fatty acid composition is very similar for all three samples. These results show that the influence of the nature of the hydrophilic part plays a role in the organization of these lipid systems.

Table 7 summarizes the physical and chemical characteristics of the studied samples: compositions and main phase transition peaks. The peaks appearing at higher temperatures for each sample are characteristic of the most stable form of the molecule to the solid state [25]. This corresponds very often to values very close to the melting temperatures [26]. By observing the data in Tables 7 and 8, it appears that the proportion of saturated and unsaturated fatty acids is similar for the three samples. However, the influence of the latter varies according to the chemical nature of the samples. For TAGs (oil of *N. Lappaceum*), phase transitions are few and are located at low temperatures, similar to those presented for monounsaturated fatty acids as oleic acid. In opposite, for 98% fatty acid samples and 100% monoglycerides, phase transitions are numerous, especially for the 100% monoglyceride at high temperatures. Here, the influence of saturated fatty acids, with higher melting temperatures than the monounsaturated fatty acids, is dominating. It therefore appears that the chemical nature of the polar part determines the influence of physical molecules.

The crystalline organization of fatty acids and monoglycerides of *N. Lappaceum* is confirmed cross-polarization microscopy in Figures 7 and 8. With these pictures we demonstrated that the samples of fatty acids and monoglycerides are organized. We could suppose that *N. Lappaceum* hydrolyzed fatty acids were organized very homogeneously under lamellar form as we can see aligned ridges (Figure 7). High melting temperature involved that long chain saturated fatty acids (high melting temperature) interacted with monounsaturated fatty acids [27] (low melting temperature), otherwise the melting temperature of the mixture should be lower or inhomogeneous. In the case of monoglycerides, non-ionic molecules, the interactions between polar heads were lower than those between polar heads fatty acids. Hydrophobic interactions between saturated hydrocarbon chains were preponderant which could lead to self-assembling of saturated monoglycerides. That is what we see on the figure 8, with light aggregates black dots scattered. This organization seems to be organogel like. The continuous

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

and stabilizing phase was constituted by long chain saturated monoglycerides and the oil liquid phase constituted by mono unsaturated monoglycerides.

4. Conclusion

Enzymatic hydrolysis of *N. Lappaceum* oil first reveals a composition of unsaturated fatty acids / saturated fatty acids = 1.75. The composition of this oil rich in essential fatty acids is qualified in food and has a high chemical and physical stability.

During the esterification of fatty acids released by enzymatic hydrolysis, the yield of monoglycerides C20: 0 and C20: 1 reflects the fatty acid composition of *N. Lappaceum* oil with a slight enrichment in C20: 1 fatty acid. A reaction is conducted in the presence of water without the addition of third solvent and whose contact with the reagents is promoted by the organization in emulsion and microemulsion.

On the other hand, the presence of these long-chain compounds (C20: 0 and C20: 1) in the mixture at high concentration could affect the physical properties in such a mixture including the melting temperatures that will be quite high (about 60 °C or more) a result shown by the DSC technique. In addition, this mixture of monoglycerides provides chemical stability to the double bond of C18: 1 and C20: 1 monoglycerides towards oxidation or other type of the physico-chemical constraints (pH, light, temperature). This physicochemical protection would be provided by the conformation of a-monoglyceride C20: 0 controlling the phase transition of such mixtures, as observed by DSC.

Moreover, monitoring the ratio unsaturated / saturated in synthesis of long chain monoglycerides mixtures, it is possible to control the structures of the obtained mixtures, and therefore control the physicochemical properties, in particular, the emulsifying properties for including the intended application in the food industry, cosmetics and pharmaceuticals.

This work of lipochemistry allowed showing the influence of pure isolated fatty acids from vegetable oils for the synthesis of monoglycerides in high purity. Their crystalline properties revealed a complex mixture of crystalline states. Polymorphic structures are generated by the presence of individual molecules and of their mixture. The originality of this oil is unique in plants. The *N. Lappaceum* is the species producing the oil with the higher arachidic acid content (> Jojoba) and has a monounsaturated acid content (eicosenoic acid) comparable to that of herring but more thermally stable to oxidation.

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

This study focused on the transformations of reserve lipids of the species *Nephelium lappaceum* Linn (*N. lappaceum*) which constitute our model for an exploratory study of the transition from native triglycerides to homogeneous triglycerides.

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

Acknowledgments

The authors would like to thank the France/Congo Cooperation Commission, the 'Agence Universitaire de la Francophonie', Dr. P. HUET from ESPA Company (INPT contract 2008-0071) and EGIDE French Agency for financial support.

References

- [1] F.D. Gunstone, F.B. Padley; *Lipid technologies and applications*. Marcel Dekker, Inc. (NewYork) 1997.
- [2] D.M. Small, *Glycerides*. In: *The physical chemistry of lipids, from Alkanes to Phospholipids*, Eds. D.J Hanahan, Handbook of lipid research series, vol. 4. (NewYork) 1986, pp. 475-522.
- [3] Sato, K., Crystallization behaviour of fats and lipids, a review, *Chem. Eng. Sci.* 2001, **56**, 2255-2265.
- [4] Kaban, J.J., Chemistry and biology of monoglycerides in cosmetics formulations. In: *Glycerine: A Key Cosmetic Ingredient*. Cosmetic Science and Technology Series/vol 11. Ed. By E. Jungermann and Norman O.V. Sonntag 1991, Marcel Dekker, Inc. pp 311-344.
- [5] Brokaw, G.Y., Lyman, W.C., The behaviour of distilled monoglycerides in the presence of water, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1958, **35**, 49-52.
- [6] Z. Mouloungui, E. Mechling; international Patent 2004/022677 (2003).
- [7] Eychenne, V., Mouloungui, Z., High concentration of 1-(3-)monoglycerides by direct partial esterification of fatty acids with glycerol, *Fett - Lipid*, 1999, **101**, 424-427.
- [8] Deleu, M., Vacas-Medina, G., Fabre, J.F. Roiz, J., Valentín, R., Mouloungui, Z., Interfacial properties of oleosins and phospholipids from rapeseed for the stability of oil bodies in aqueous medium, *Colloids Surf. B*, 2010, **80**, 125-132.
- [9] Eychenne, V., Mouloungui, Z., High concentration of 1-(3-)monoglycerides by direct partial esterification of fatty acids with glycerol, *Fett - Lipid*, 1999, **101**, 424-427.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- [10] Roche, J., Boumols A., Moulongui, Z., Barranco, T., Cerny M., Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2006, *108*, 287-297.
- [11] Nde Bup, D., Kpsen, C. Matos, L., Mabiila, B., Moulongui, Z., Influence of physical pretreatments of sheanuts (*Vitellaria paradoxa Gaertn.*) on butter quality, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2001, *113*, 1152-1160.
- [12] Ibrahim C.O. N. N., Nagai S., Fat Hydrolysis and Esterification by a Lipase from *Humicola lanuginosa*, *Agrie. Biol. Chem.*, 1987, *51*, 2153-2159.
- [13] FPN Cional Regal, *Table de composition des corps gras, Répertoire général des aliments*, Tec & doc Lavoisier Ed. Paris, 1987.
- [14] *Fats and oils in human nutrition: report of a joint expert consultation*, FAO Food and Nutrition Paper No. 91, 2008.
- [15] Sirisompong, W., Jirapakkul, W., Klinkesorn, U., Response surface optimization and characteristics of rambutan (*Nephelium lappaceum L.*) kernel fat by hexane extraction, *LWT - Food Science and Technology*, 2011, *44*, 1946-1951.
- [16] Kalayasiri P., Jeyashoke N., Krisnangkura K., Survey of seed oil for use as diesel fuels, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, *73*, 471-474.
- [17] Augustin, M.A. Chua, B.C., Composition of Rambutan seeds, *Pertanika*, 1988, *11*, 211-215.
- [18] Solis-Fuentes, J.A., Camey-Otiz, G., del Rosario Hernandez-Medel, M. Composition, phase behavior and thermal stability of natural edible fat from rambutan (*Nephelium lappaceum L.*) seed, *Bioresource Technol.*, 2010, *101*, 799-803.
- [19] Winayawanwatkun, P., Kaewpiboon, C., Piriyanananon, K., Tantong, S., Thakernarkarnkit, W., Chulalaksananukul, W., Yongvanich, T., Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand, *Biomass and Bioenergy*, 2008, *32*, 1279-1286.
- [20] Karmakar, A., Karmakar, S., Mukherjee, S., Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production, *Bioresource Technol.*, 2010, *101*, 7201-7210.
- [21] Kumar, A., Sharma, S., Potential non-edible oil resources as biodiesel feedstock: An Indian perspective, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2011, *15*, 1791-1800.
- [22] Brand, S., Lepiniec, L., Physiological and developmental regulation of seed oil production, *Prog. Lipid Res.*, 2010, *49*, 235-249.
- [23] A. Thomas: *Fats and Fatty Oils*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
- [24] M. Bockisch: *Fats and Oils Handbook* AOCS press, Champaign (US), 1998.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

- [25] Lutton, E., Fehl, A., The polymorphism of odd and even saturated single acid triglycerides, *Lipids*, 1970, *5*, 90-99.
- [26] Knothe, G., Dunn R., A Comprehensive Evaluation of the Melting Points of Fatty Acids and Esters Determined by Differential Scanning Calorimetry, *J Am Oil Chem Soc*, 2009, *86*, 843-856.
- [27] Ghabode, G., Negrier, P., Mondieig, D., Moreno, E., Calvet, T., Cuevas-Díaz, M.A., Fatty acids polymorphism and solid-state miscibility: Pentadecanoic acid/¹²C hexadecanoic acid binary system, *J. Alloy. Compd.*, 2009, *469*, *1*, 539-551.

Figure Captions

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Figure 1: Kinetics of hydrolysis of the *N. Lappaceum* oil.
- Figure 2: Esterification reaction of fatty acids with glycerol.
- Figure 3: Kinetics of esterification reaction of *N. Lappaceum* fatty acids with glycerol.
- Figure 4: *N. Lappaceum* oil thermogramm.
- Figure 5: Thermogramm of *N. Lappaceum* 98% fatty acids (39.6% C18:1; 28.3% C20:0; 16.13% C20:1).
- Figure 6: Thermogramm of *N. Lappaceum* 100% monoglycerides (47.2% MG-C18:1; 26.3% MG-C20:0; 10.9% MG-C20:1).
- Figure 7: Optical microscopy image of a cross-polarized sample of *N. Lappaceum* 98% fatty acids, magnification $\times 100$.
- Figure 8: Optical microscopy image of a cross-polarized sample of *N. Lappaceum* 100% monoglycerides, magnification $\times 100$.

			<i>N. Lappaceum</i> oil 78.9% Free fatty acids	Herring oil (<i>Clupea</i> <i>harengus</i>) [13]
	Formula	Name	<i>N. Lappaceum</i> oil	Unsaturated/Saturated = 1.76
			R. Monounsaturated/ saturated = 1.54	Monounsaturated/ saturated = 1.54
8	C16:0	Palmitic acid	4.9 ± 0.13	8.18
9	C18:0	Stearic acid	6.3 ± 0.26	0.12
10	C18:1	Oleic acid	44.7 ± 0.47	39.94
11	C18:2	Linoleic acid	2.7 ± 0.32	7.65
12	C20:0	Arachidic acid (Eicosanoic acid)	28.6 ± 0.58	26.63
13	C20:1	Gadoleic acid (11- Eicosenoic acid)	8.1 ± 0.22	16.13
14	C22:0	Behenic acid	2.6 ± 0.03	1.34
15				-
26	Formula	Name	Monoglycerides 7.7% Composition (%)	Diglycerides 12.6% Composition (%)
27	C16:0	Palmitic acid	30.84	6.44
28	C18:0	Stearic acid	0	0
29	C18:1	Oleic acid	21.3	70.54
30	C18:2	Linoleic acid	0	0
31	C20:0	Arachidic acid (Eicosanoic acid)	42.76	0
32	C20:1	Gadoleic acid (11- Eicosenoic acid)	1.62	23.02
33	C22:0	Behenic acid	3.48	0

Table 1: Relative composition of *N. Lappaceum* oil, free fatty acid composition of hydrolyzed *N. Lappaceum* oil and fatty acid composition of monoglycerides and diglycerides in the hydrolyzed oil.

Common name	Scientific name	Anchidic acid content C20:0 (%)	Gadoleic acid content C20:1 (%)	References
Rambutan	Hydrolyzed <i>N. lappaceum</i> oil	28.0	16.13	Our work
Rambutan	<i>N. lappaceum</i> oil	28.6	8.1	Our work
Rambutan	<i>N. lappaceum</i> oil	22.05	-	[19]
Rambutan	<i>N. lappaceum</i> oil	34.32	0.66	[15]
Rambutan	<i>N. lappaceum</i> oil	33.1	7.2	[16]
Rambutan	<i>N. lappaceum</i> oil	36.5	7.2	[17]
Rambutan	<i>N. lappaceum</i> oil	34.5	6.3	[18]
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i> L.	1.28	1.2	[19]
Coconut	<i>Cocos nucifera</i>	0.04	-	[19]
Palm	<i>Elaeis guineensis</i>	0.23	-	[19]
sunflower	<i>Helianthus annuus</i> L.	0.15	0-0.2	[19]
Castor	<i>Ricinus communis</i> L.	3.79	-	[19]
Jojoba	<i>Simmondsia chinensis</i>	28.0-31.0	-	[20]
Kusum	<i>Schleichera trigyna</i>	15.79	6.17	[21]
Rape	<i>Brassica napus</i>	-	9	[22]

Table 2: Comparison in anchidic acid (C20:0) and eicosenoic acid (C20:1) contents between hydrolyzed *N. Lappaceum* oil and oils other species described in the literature.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

sampling time	Relative composition (%)			
	TG	DG	MG	AG
0 min	0.8	12.6	7.7	78.9
15 min	0.55	25.3	58.2	16.0
45 min	0.34	25.5	58.9	15.3
60 min	0.24	28.8	57.5	13.5

13 Table 3: Relative composition (%) of the reaction medium of the esterification reaction of *N*
14 *Lappaceum* fatty acids with glycerol.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Monoglycerides	Monoglycerides Relative composition (%)
C16:0	4.3
C18:2	4.6
C18:1	44.9
C18:0	4.9
C20:1	12.2
C20:0	26.4
C22:0	2.7

Table 4: Monoglycerides relative composition (%) in the reaction medium of the esterification of fatty acids of *N. Lappaceum* with glycerol.

	Molar compositions (%)	
Free fatty acids	0.0	0.0
Mono glycerides	100.0	100.0
C16:0	8.1	5.34
C18:2	3.2	5.1
C18:1	34.5	47.2
C18:0	0.89	5.2
C20:1	6.6	10.9
C20:0	46.7	26.3
C22:0	0.0	0.0
Diglycerides	0.0	0.0

Table 5: Proportion and molar composition of monoglycerides of *N. Lappeanum* obtained by flash chromatography purification.

Samples	Melting Temperature (°C)	% C18:1	% C20:0	% C20:1	References
<i>N. Lapaceum</i> oil	20	39.9	26.6	8.1	
<i>N. Lapaceum</i> 98.9% fatty acids	63	39.6	28.3	16.13	
Oleic acid	16	100.0	0.0	0.0	[23]
Arachidic acid	75	0.0	100.0	0.0	[23]
Eicosenoic acid	23	0.0	0	100	[23]
100% Monoglyceride (1)	56	34.4	46.7	6.6	
100% Monoglyceride (2)	51	47.2	26.3	10.9	
Glyceryl monooleate 100%	35	100.0	0.0		[23]
Glyceryl monoaarchidate 100%	84	0.0	100.0		[23]
Fatty acids reconstitution Monoglycerides	28	39.6	28.3		
Reconstitution 1 Monoglycerides	51	34.4	46.7		
Reconstitution 2	39	47.2	26.3		

Table 6: Characteristics and physical properties of different samples.

			Compositions (molar %)	
	Fatty acids	Name	<i>N. Lappacum</i> oil	Fatty acids 98% Monoglycerides 100%
8	C16:0	Palmitic acid	4,9	8,2
9	C18:0	Stearic acid	6,3	0,1
10	C18:1	Oleic acid	44,7	39,9
11	C18:2	Linoleic acid	2,7	7,7
12	C20:0	Arachidic acid	28,6	26,6
13	C20:1	Gadoleic acid	8,1	16,1
14	Ration unsaturated/saturated fatty acids		0,72	0,55
15	Phase transition peaks at 19,4°C		-34°C, -13°C, 8°C 5,4°C, 4°C, 55°C, 59°C, 60°C, 62°C	14,9°C, 2,5°C, 29,3°C, 40,7°C, 49,5°C, 50,5°C, 51,7°C, 53,2°C, 54,1°C, 58,7°C

Table 7: Fatty acid composition and thermal characteristics of the studied samples.

	Melting temperature (°C)	references
Oleic acid	16	[23]
Arachidic acid	75	[23]
Glycerol monoleate	35	[23]
Glycerol monoarachidonate	84	[23]
Glycerol monoeicosenote	nd	
Glycerol trioleate	5.5	[23]
Glycerol triarachidonate	78	[25]

Table 8: Melting temperatures of isolated compounds (literature data).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

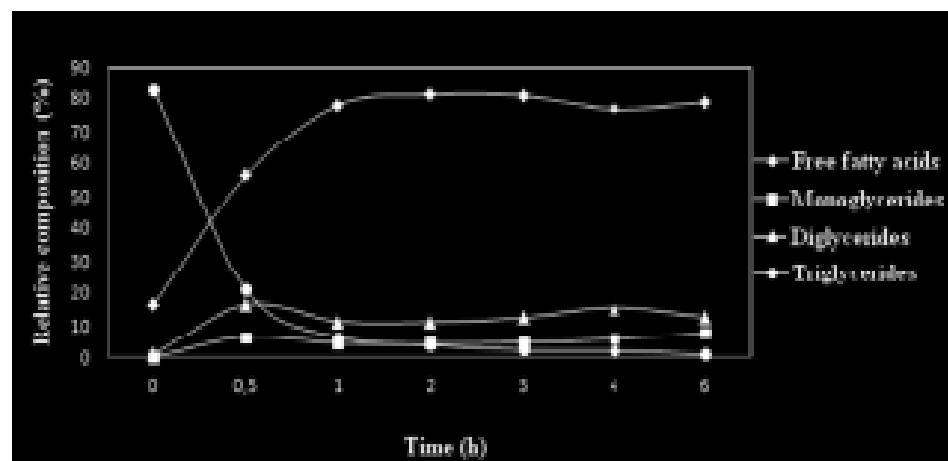


Figure 1: Ngakegni-Limbili et al.

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

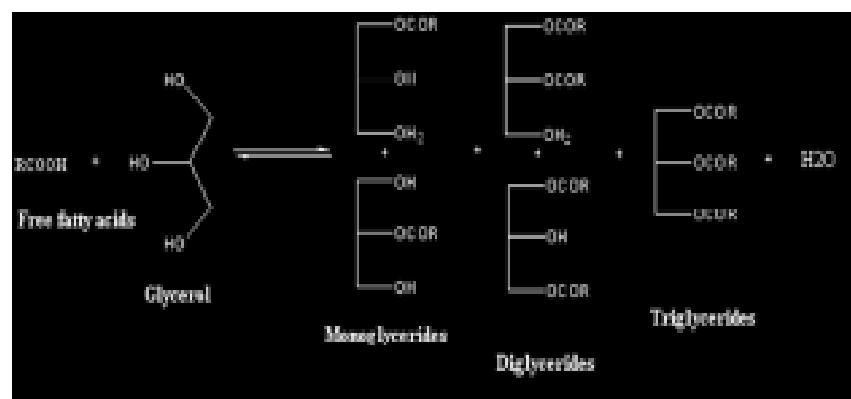


Figure 2: Ngakegni-Limbili et al.

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

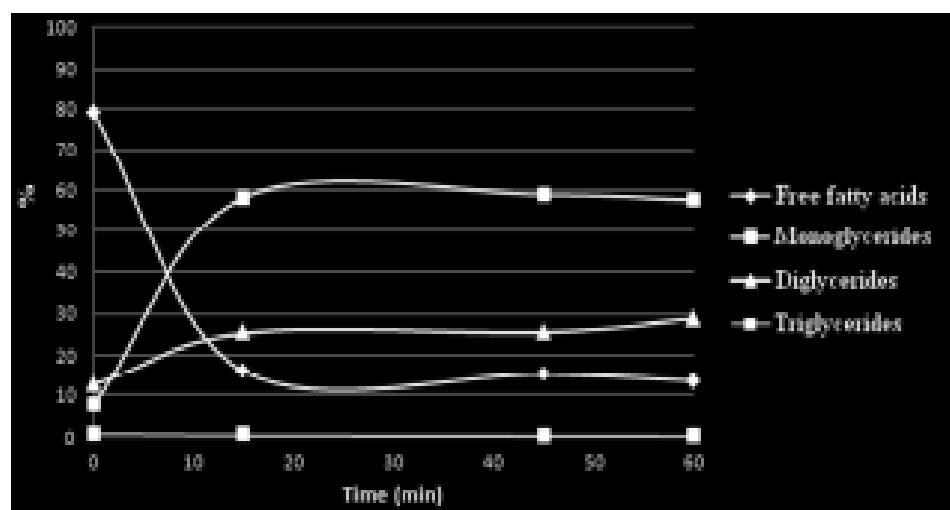


Figure 3: Ngakegni-Limbili et al.

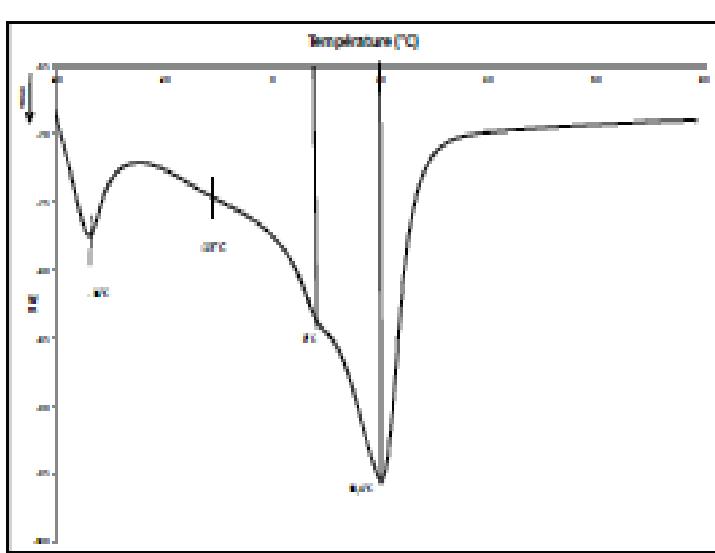


Figure 4: Ngakegni-Limbili et al.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

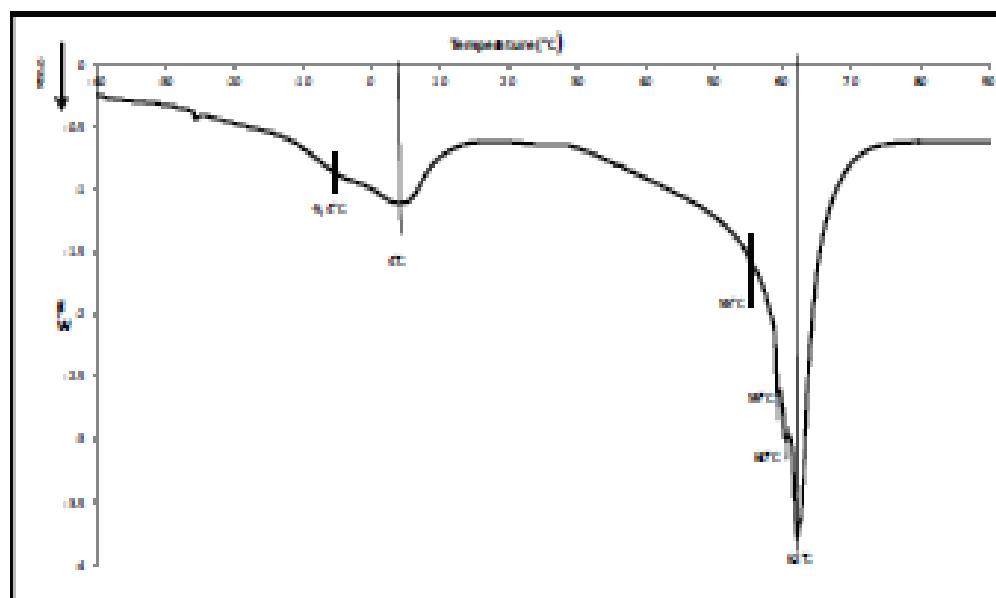


Figure 5: Ngakegni-Limbili et al.

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

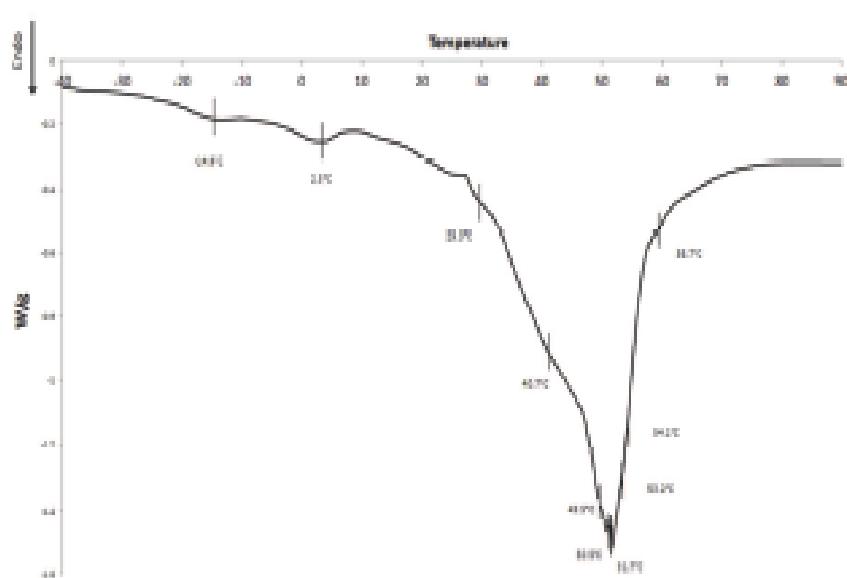


Figure 6: Ngakegni-Limbili et al.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16



17
18 Figure 7: Ngakegni-Limbili et al.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Figure 8: Ngakegni-Limbili et al.