

## Étude phytochimique, caractérisation GC-MS et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Letestua durissima*.

ELLA NKOOGO Ley-Fleury<sup>1</sup>, DUMARÇAY Stéphane<sup>1</sup>, EDOU ENGONGA Prosper<sup>2</sup>,  
GERARDIN Philippe<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Lorraine, INRAE, EA 4370 USC 1445 LERMAB, Faculty of Sciences and Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

<sup>2</sup>Normal Superior School, Department of Physical Sciences, LAPLUS Multidisciplinary Science Laboratory, Hight School Avenue, B.P. 17009, Libreville, Gabon

[ellankogoleyf@gmail.com](mailto:ellankogoleyf@gmail.com)

**Mots clés :** antioxydant ; caractérisation ; polyphénols ; extrait ; *Letestua durissima* ; valorisation.

### Contexte et objectifs

Le Gabon est un pays riche en ressources forestières, avec environ 85 % de son territoire couvert de forêts tropicales. Ces forêts sont principalement composées d'essences de bois durs tropicaux, qui sont très prisées sur les marchés nationaux et internationaux en raison de leur qualité et de leur durabilité. Selon la norme européenne EN 350, qui classe la durabilité naturelle des bois, certaines essences, comme l'Azobé ou l'Okan, présentent une résistance élevée à la décomposition. La valorisation des bois tropicaux est devenue un enjeu majeur pour le Gabon. La valorisation consiste à transformer les produits forestiers bruts en produits finis à forte valeur ajoutée, afin de maximiser les retombées économiques et environnementales pour le pays. Le Gabon a mis en place plusieurs initiatives pour valoriser ses ressources forestières, notamment à travers la promotion de l'industrie du bois innovante qui valorise pleinement une forêt gérée de manière durable et l'encouragement de la transformation locale des produits forestiers. Une perspective prometteuse consisterait à exploiter les substances extractibles présentes dans les essences de bois à haute durabilité naturelle, telles que *Letestua durissima*, qui est utilisée dans la médecine traditionnelle pour ses propriétés médicinales (Mouele al, 2022), afin de découvrir de nouvelles molécules. La valorisation des sous-produits issus de la première transformation du bois revêt ainsi une importance cruciale pour accroître la rentabilité de la chaîne de transformation du bois, en permettant la mise en place de nouvelles applications innovantes.

### Méthodes

L'échantillonnage a été réalisé au Gabon dans la province du Woleu-Ntem. Les différentes parties (écorce, aubier et bois de cœur) de *Letestua durissima* ont été collectées à l'aide d'une machette et d'une tronçonneuse (08/04/2021).

#### *Extraction*

Pour les extractions au Soxhlet, environ 7 g des différentes sciures (granulométrie 0,16 mm) préalablement séchées à 70°C dans une étuve pendant 24 heures ont été soumis à un cycle d'extraction successive avec des solvants de polarité croissante : cyclohexane, dichlorométhane, acétone, toluène/éthanol et eau (la durée d'extraction par solvant est de 24 heures).

#### *Screening phytochimique*

Les réactifs utilisés pour effectuer le screening phytochimique des extraits ont été préparés et utilisés selon les protocoles décrits par Houghton et Raman (1998), Akinjogunla et al (2010) et Badiaga (2011). Tous les différents tests ont été effectués en triplicat.

#### *Dosage des polyphénols totaux*

La méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrite par Wooton-Beart et al (2011) a été utilisée pour le dosage en phénols totaux de nos extraits.

#### *Dosage des tanins condensés*

La technique d'acide/butanol décrite par Chamorro et al. (2012) a été utilisée pour évaluer les tanins condensés contenus dans les extractibles.

#### *Dosage des flavonoïdes*

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium  $AlCl_3$  décrite par Shraim et al (2021).

#### *Analyse GC/MS*

L'appareil GC-MS de type Perkin Elmer Clarus 680 a été utilisé pour les analyses. Environ 1 à 2 mg d'extraits secs ont été prélevés dans les piluliers. Les échantillons de différents solvants ont subi une dérivation (réaction de silylation) avant l'injection afin de faciliter la solubilisation et la volatilité de tous les composés présents. Pour cela, 50  $\mu$ L de N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) ont été ajoutés dans les piluliers puis laissés pendant 24 heures dans une étuve à 70°C. Après cette étape, le BSTFA a été évaporé, et l'extrait dérivé a ensuite été dissout dans 1 ml d'acétate d'éthyle. 1 à 3  $\mu$ L de cette solution ont été injectés dans le chromatographe.

#### *Activité antioxydante*

L'activité antioxydante a été évaluée par le radical DPPH selon la méthode décrite par Anokwuru et al (2017) avec le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

L'activité antioxydante a été évaluée par le radical cationique ABTS<sup>+</sup> selon la méthode décrite par Piccolella et al (2008) avec le radical cationique 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

## **Résultats**

#### *Taux d'extraits*

Les résultats obtenus indiquent que les taux d'extractibles varient d'un solvant à l'autre et avec la partie de l'arbre utilisée. Les taux d'extraits sont plus élevés pour l'écorce suivi de l'aubier puis le duramen. La littérature des bois tropicaux rapporte des taux d'extraits plus élevés au niveau de l'écorce que les autres parties de l'arbre (aubier et duramen) (Pohjamo et al 2003, Bopenga et al 2020, Ella et al 2022).

L'extraction successive qui combine solvants apolaires et polaires permet de partitionner les extractibles en différentes fractions facilitant les analyses ultérieures et la somme des extraits avec chaque solvant donne une idée de la teneur globale en extraits des écorces. Les taux d'extraits globaux des différentes parties étudiées sont de 7,69 % dans le duramen, 11,61% dans l'aubier et 37,3% dans l'écorce.

#### *Tests phytochimiques*

Les tests phytochimiques effectués sur *Letestua durissima* ont révélé la présence d'alcaloïdes, de polyphénols, de stérols et de triterpènes, de flavonoïdes et de saponines. La présence de toutes ces classes de composés dans les bois tropicaux a été reportée dans la littérature (Mounguengui et al 2016).

#### *Polyphénols totaux*

La concentration moyenne en polyphénols des parties de bois de *Letestua durissima* présente de différence significative d'un solvant à l'autre, d'une partie du bois à une autre. Les teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions varient entre 95,56 et 47,64 mg d'équivalent acide gallique/g d'extraits secs. La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait acétonique, avec un taux de 95,56 mg d'équivalent acide gallique/g d'extraits secs, par rapport aux extraits toluène-éthanol et aqueux, où nous enregistrons des teneurs de l'ordre de 92,4 et 64,06 mg d'équivalent acide gallique/g d'extraits secs respectivement. Ce résultat s'explique par le fait que l'acétone est le premier solvant polaire utilisé suivi du mélange toluène-éthanol après l'extraction au dichlorométhane qui extrait les composés lipophiles ou les huiles contrairement à l'acétone qui extrait les composés phénoliques. La partie de l'écorce présente les meilleures concentrations en polyphénols suivie de l'aubier et enfin le duramen. Plusieurs travaux sur l'étude de vingt-deux bois tropicaux ont montré des résultats similaires (Saha-Tchinda et al 2015, Bopenga et al 2020).

#### *Tanins totaux*

Les résultats révèlent que les fractions acétone et toluène-éthanol de l'écorce de *Letestua durissima* renferment les plus importantes concentrations en tanins condensés, avec une valeur de 109,12 et 113,45 en équivalents mg catéchine/g d'extraits secs suivi du duramen qui a une teneur en tanins dans les extraits acétone (77,45 en équivalents mg catéchine/g d'extraits secs), toluène-éthanol 69,12 en équivalents mg catéchine/g d'extraits secs et aqueux 45,45 en équivalents mg catéchine/g d'extraits secs. Les faibles fractions étaient enregistrées dans l'aubier 61,62 ; 43,95 et 33,95 en équivalents mg catéchine/g d'extraits secs (respectivement dans l'extrait acétonique, le mélange toluène-éthanol et l'extrait aqueux). Cette variation peut s'expliquer par le fait que l'extraction des tanins condensés, dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires (Deba et al 2008).

#### *Flavonoïdes totaux*

Les résultats présentés montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents extraits et parties de bois (écorce, aubier et duramen). Les plus fortes concentrations en flavonoïdes se trouvent au niveau de l'écorce suivi du duramen et de l'aubier. L'extrait au toluène-éthanol enregistre la plus grande concentration en flavonoïdes (20,26 en équivalents mg catéchine/g d'extrait secs), suivi par l'extrait acétone (19,01 en équivalents mg catéchine/g d'extraits secs). Tandis que la plus faible concentration en flavonoïdes a été mesurée dans l'extrait aqueux (1,11 en équivalents mg catéchine/g d'extraits secs). La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante *Letestua durissima*, dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits (Marco et al 1968), de la partie de l'arbre étudiée. Les teneurs en flavonoïdes dans les extraits acétoniques et le mélange toluène-éthanol de l'aubier de *Letestua durissima* sont similaires à celles trouvées pour l'aubier du bois de *Coula edulis* (Bopenga et al 2021).

#### *Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)*

L'analyse de l'extrait d'écorce au cyclohexane par GC/MS indique la présence de nombreux terpènes dans le cyclohexane (également présent dans l'extrait au dichlorométhane) avec l'oléan-12-en-3-one et le (3 $\alpha$ )-oléan-12-en- Acétate de 3-yle comme composants principaux,

20% et 46% du courant ionique total (TIC). D'autres triterpènes comme les  $\alpha$  et  $\beta$ -amyrines ou la bétuline ont également été identifiés. Les mêmes composés ont été détectés dans l'extrait de dichlorométhane mélangé à d'autres composés comme les acides gras et les composés phénoliques (3,4-dihydroxybenzaldéhyde, acide 4-hydroxybenzoïque, acide isovanilique, acide protocatéchique) apparaissant à des temps de rétention (TR) inférieurs à ceux des terpènes. L'analyse de l'extrait acétonique indique la présence de composés assez similaires à ceux identifiés dans le dichlorométhane. Différents acides carboxyliques comme les acides benzoïque, sébacique, protocatéchique, hexadécanoïque, oléique ou octadécanoïque ont été identifiés et représentent 25% du TIC. Les produits restants identifiés dans les extraits acétoniques correspondent aux mêmes composés terpénoïdes que ceux identifiés dans le cyclohexane et le dichlorométhane. L'écorce de *Letestua durissima* apparaît donc comme une riche source de triterpènes.

L'aubier contient de grandes quantités d'oléan-12-én-3-one et de (3 $\beta$ )-oléan-12-én-3-yle représentant respectivement 20 et 39% du TIC, tandis que le bois de cœur contient des triterpènes en quantités relativement faibles. Dans tous les cas, à l'exception de la catéchine et de l'acide protocatéchique détectés dans l'extrait acétonique d'écorce, relativement peu de composés phénoliques ont été détectés dans les différents compartiments du bois. L'analyse des extraits d'aubier et de bois de cœur utilisant un solvant plus polaire comme l'acétone indique principalement la présence d'acides gras et de sucres. L'analyse GC-MS de l'extrait toluène/éthanol des différents compartiments (écorce, aubier et bois de cœur) a révélé uniquement la présence de sucres.

#### *Tests antioxydant*

Il ressort que l'activité antioxydant varie avec les différents solvant d'extraction et de la partie de l'arbre utilisé. La catéchine et le BHT ont présenté une activité antioxydante plus importante que les extractibles étudiés. En général, les valeurs de  $CE_{50}$  obtenues dans les différents solvants montrent une bonne capacité d'inhibition des radicaux DPPH. L'écorce et le duramen présentent les plus fortes activités antioxydantes. Pour la méthode DPPH, les extraits toluène-éthanol et acétone ont eu la plus petites valeurs  $CE_{50}$  (2,4 ppm et 2,39 ppm respectivement).

Le criblage phytochimique et les dosages des composés phénoliques ont mis en évidence la présence de plusieurs familles d'extractibles tels que les flavonoïdes, tanins et les polyphénols qui sont connus dans la littérature comme des très bons antioxydants (N'Guessan et al 2007, Trembl et Šmejkal 2016). La présence des tanins, des polyphénols et des flavonoïdes suggère la capacité de certains extraits de jouer un rôle majeur en tant qu'agent antioxydant (Tepe et al 2006, Kawamura et al 2011, Agati et al 2012). De plus, les analyses GC/MS de ces extractibles ont permis d'identifier des potentiels antioxydant comme la catéchine et les composés comme  $\beta$ -Amyrine, Olean-12-ène-3-one, Friedelan-3-one, Bétuline et le Stigmastérol qui peuvent être responsables de l'amélioration de l'activité antioxydante.

#### **Conclusion**

La détermination des teneurs en extraits a indiqué que l'écorce de *Letestua durissima* contenait des quantités plus élevées d'extraits que l'aubier et le bois de cœur. La teneur totale en extraits de l'écorce en utilisant des solvants de différentes polarités a atteint jusqu'à 37 %. Les analyses phytochimiques ont montré la présence de flavonoïdes, de polyphénols et de saponines dans les extraits des différents types de bois obtenus avec des solvants polaires tels que l'acétone, le toluène/éthanol (2/1, v/v) et l'eau, tandis que des terpènes et des terpénoïdes ont été détectés dans un solvant de polarité inférieure tel que le dichlorométhane. Des alcaloïdes ont été détectés dans tous les extraits, quel que soit le compartiment du bois. Les teneurs totales en polyphénols, tanins condensés et flavonoïdes ont confirmé les quantités élevées de composés détectés dans

les extraits d'écorce et de bois de cœur obtenus en utilisant des solvants polaires tels que l'acétone et le toluène/éthanol. L'analyse GC-MS des différents extraits a montré que les extraits d'écorce au dichlorométhane et à l'acétone contenaient des terpènes et des terpénoïdes, l'acétate de  $\beta$ -amyrine et l'éther triméthylsilylé d' $\alpha$ -amyrine étant les principaux composants. La présence d'acides gras, de polyphénols et d'acides phénoliques a été détectée dans les extraits d'écorce et de bois de cœur obtenus avec des solvants à polarité plus élevée. La mesure des activités antioxydantes à l'aide de l'activité de piégeage des radicaux ABTS<sup>+</sup> ou DPPH a indiqué que les extraits de bois de cœur et d'écorce à l'acétone ou au toluène/éthanol avaient les valeurs de CI<sub>50</sub> les plus faibles. L'extrait d'écorce au toluène-éthanol et l'extrait de bois de cœur à l'acétone présentaient des valeurs de CI<sub>50</sub> assez similaires de 2,40 et 2,39, respectivement, pour le test DPPH, tandis que la catéchine et le BHT présentaient des valeurs de 1,95 et 3,31, respectivement. L'extrait de bois de cœur au toluène/éthanol a affiché les valeurs IC<sub>50</sub> les plus faibles de 0,66 pour le test ABTS<sup>+</sup> en comparaison avec les valeurs de 0,38 et 0,46 pour la catéchine et le BHT, respectivement. Une comparaison avec les activités antioxydantes de la catéchine ou du BHT a indiqué que l'extrait de bois de cœur au toluène/éthanol présentait des activités antioxydantes plus ou moins similaires à celles de ces deux composés de référence, suggérant une valorisation potentielle en tant qu'antioxydant. Les relations structure-activité attribuent les propriétés antioxydantes de ces extraits à la présence de composés phénoliques contenus dans les extraits de bois de cœur et d'écorce.

## Références

- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance, *Plant Sci* 196: 67-76.
- Akinjogunla OJ, Yah CS, Eghafona NO, Ogbemudia FO (2010) Antibacterial activity of leave extracts of *Nymphaea lotus* (Nymphaeaceae) on Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) isolated from clinical samples, *Annals of Biological Research* 1:174-184.
- Anokwuru C, Sigidi M, Zininga T, Tshisikhawe M, Shonhai A, Ramaite I, Traoré A, Potgieter N (2017) Phenolic contents, antioxidant activity and spectroscopic characteristics of *Pterocarpus angolensis* DC. stem bark fractions, *NISCAIR* 16: 400–406.
- Badiaga M, (2011) Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de l'Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Bopenga Bopenga CSA, Meyo Degboevi H, Candelier K, Edou Engonga P, Dumarcay S, Thévenon MF, Gérardin Charbonnier C, Gérardin P (2021) Characterization of Extracts from the Bark of the Gabon Hazel Tree (*Coula edulis* Baill) for Antioxidant, Antifungal and Anti-Termite Products. *Journal of Renewable Materials*, 9(1): 17-33.
- Chamorro S, Viveros A, Alvarez I, Vega E, Brenes A (2012) Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment, *Food Chemistry*, 133, 308–314.
- Deba F, Dang Xuan T, Yasuda M, Tawata S (2008) Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*, 19 ,346-352.
- Ella Nkogo LF, Bopenga Bopenga CSA, Ngohang FE, Mengome LE, Aboughe Angone S, Edou Engonga P (2022) Phytochemical and anti-termite efficiency study of *Guibourtia*

*Tessmannii* (Harms) J. Léonard (Kévazingo) bark extracts from Gabon. *J. Korean Wood Sci Technol*, 50, 113-125.

Houghton P, Raman A (1998) *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts* Springer US ISBN 978-1-4615-5809.

Kawamura F, Ramle S, Sulaiman O, Hashim R, Ohara S (2011) Antioxidant and antifungal activities of extracts from 15 selected hardwood species of Malaysian timber. *Eur J Wood Prod* 69(2):207–221.

N'guessan JD, Zirihi GN, Kra AKM, Kouakou K, Djaman AJ, Guédé-Guina F (2007) Activité de piégeage des radicaux libres, flavonoïdes et teneurs phénoliques de plantes ivoiriennes sélectionnées. *IJONAS*, 4: 425-429.

MARCO, Gino J (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1968, vol. 45, no 9, p. 594-598.

Mouele UGM, Nkoulembene CA, Kokolo B, Sevidzem SL (2022) Ethnobotanical and ethnopharmacological approach to ichthyotoxic plants of Gabon, *Journal of Medicinal Plants Research*, 16(5), 154-164.

Mounguengui WS, Saha Tchinda JB, Kor Ndikontar M, Dumarçay S, Attéké C, Perrin D, Gelhaye E, Gérardin P (2016) Total phenolic and lignin contents, phytochemical screening, antioxidant and fungal inhibition properties of the heartwood extractives of ten Congo Basin tree species, *Annals of Forest Science*, 73, 287–296.

Piccolella S, Fiorentino A, Pacifico S, D'Abrosca B, Uzzo P, Monaco P (2008) Antioxidant properties of sour cherries (*Prunus cerasus* L.): Role of colorless phytochemicals from the methanolic extract of ripe fruits. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1928-1935.

Pohjamo SP, Hemming JE, Willför SM, Reunanen MHT, Holmbom BR (2003) Phenolic Extractives in *Salix caprea* Wood and Knots. *Phytochemistry*. 63(2), 165–69

Saha Tchinda JB (2015) Caractérisation et valorisation des substances extractibles de cinq essences camerounaises majeures de l'industrie du bois : Ayous, Moabi, Movingui, Padouk et Tali. Thèse de doctorat en sciences du bois et fibres, Université de Lorraine.

Shraim AM, Ahmed TA, Rahman MM, Hijji YM (2021) Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation, *WT Food Science and Technology*. 150 :111932.

Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Sokmen A (2006) Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey, *Food chemistry*, 95(2):200-204.

Treml J, Šmejkal K (2016) Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals, *comprehensive reviews Food Sci Food Saf* 15(4):720-738.

Wootton-Beard PC, Aisling M, Ryan L (2011) Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods *Food Res Int.*, 44, 217–224.